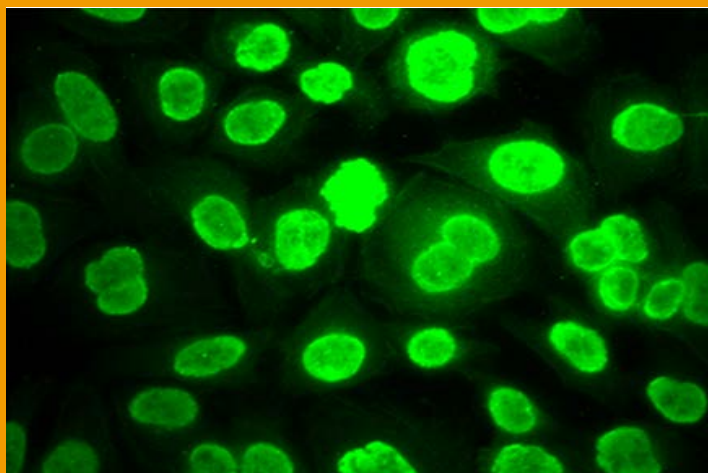


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**DESCRIPCIÓN DE UN SÍNDROME
AUTOINMUNE SIMILAR A LA
ESCLERODERMIA HUMANA EN RATONES
DEFICIENTES PARA PSGL-1. ESTUDIO
TRASLACIONAL EN HUMANOS.**



Alicia Pérez Frías

Madrid, 2015



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



DESCRIPCIÓN DE UN SÍNDROME AUTOINMUNE
SIMILAR A LA ESCLERODERMIA HUMANA EN
RATONES DEFICIENTES PARA PSGL-1. ESTUDIO
TRASLACIONAL EN HUMANOS.

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica:

Alicia Pérez Frías

para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Este trabajo se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital
Universitario de la Princesa de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Ana
Carmen Urzainqui Mayayo y el Dr. Santos Castañeda Sanz.

Ana Carmen Urzainqui Mayayo, Doctora en Ciencias Biológicas y Santos Castañeda Sanz, Doctor en Medicina,

CERTIFICAN: Que Alicia Pérez Frías, licenciada en Bioquímica por la Universidad Miguel Hernández de Elche, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título:

“Descripción de un síndrome autoinmune similar a la esclerodermia humana en ratones deficientes para PSGL-1. Estudio traslacional en humanos.”

Revisado este trabajo, los que suscriben consideran el trabajo realizado satisfactorio y autorizan su presentación para ser juzgado.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid a 1 de Junio de 2015.

Fdo. Ana C. Urzainqui Mayayo

Fdo. Santos Castañeda Sanz

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente a Ana Urzainqui la oportunidad de haber formado parte de su equipo, y su dedicación y optimismo que han sido un gran ejemplo para mí. Mi agradecimiento también a Santos Castañeda por su gran compromiso con nosotros, su inestimable ayuda, y por contribuir a que esta tesis sea posible. Gracias por todo lo que me habéis enseñado.

Agradezco profundamente a Rafa y Javi por todo su apoyo, amistad y buen humor. Me alegro muchísimo de haber podido compartir con ellos el día a día del laboratorio. Son los mejores.

Me gustaría agradecer a Norman, Reyes, María GB, Almu, Raquel, Yoli, Ainhoa, Lara y María de la F. por haber contribuido a que este trabajo salga adelante con su dedicación y optimismo, a Glenn, Encarna y Pablo por su ayuda y simpatía, a las chicas de Anatomía Patológica por su colaboración, a Hortensia por su paciencia y especialmente a Cecilia por haber podido contar con su ayuda y experiencia en este proyecto y en mi etapa predoctoral.

A mis compañeros de grupo Noelia, Eugenio, Eva, Aitana, Cristina, Álvaro, Rocío y Alba, por hacer que los días sean más divertidos. A Carlos, Bea Somovilla, Bea Colom, Itxaso, Anita, Fede y Cande porque aunque ya no soy una “resi” sigo siendo una de vosotros. Por todos los buenos momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio.

También agradezco a Víctor, Ana, Pilar, Isabel, por su amabilidad y ayuda. A Amalia, Amada, al grupo de Manolo Ortiz de Landázuri, por contribuir al buen ambiente de Inmuno. A los príncipes del CNB, Santa Cristina y CNIC: Lidia, Soraya, Arantxa y Olga, no os olvido aunque estéis lejos. Tampoco olvido a los que estuvieron en la Princesa y que contribuyeron a que este viaje fuera aún más agradable con su sabiduría y simpatía: Manu, Paco, Edu, Jorge, Alberto, Emilio, Raquel, Carmen Calabia, Carmen Sánchez y Margarita.

Mi más especial agradecimiento a mi familia, que siempre me ha apoyado y ayudado.

RESUMEN

El receptor leucocitario PSGL-1 es el ligando de las Selectinas P, E y L, y es responsable de los contactos iniciales del leucocito con el endotelio y de su rodamiento sobre él, previo a la extravasación hacia el foco de inflamación. En nuestro laboratorio observamos que, a partir de los 3 meses de edad, los ratones deficientes en PSGL-1 presentaban unas lesiones cutáneas en la piel del lomo que aparecían de forma espontánea.

El análisis histológico de la piel ha mostrado que los ratones PSGL-1^{-/-} presentan engrosamiento de la dermis por acumulación de colágeno y una disminución del número de vasos sanguíneos en la dermis, como ocurre en la esclerodermia humana, y el análisis serológico confirmó la presencia de autoanticuerpos circulantes implicados en enfermedades autoinmunes del tejido conectivo. Además, hemos detectado la presencia de infiltrados leucocíticos intersticiales en el pulmón, característica de una neumonía intersticial no específica. También hemos encontrado infiltrados intersticiales en el riñón, así como zonas infartadas debidas a eventos isquémicos y una disminución en la función renal expresada con un aumento de urea y creatinina en suero y la detección de proteínas y sangre en la orina. Además, tanto en el pulmón como en el riñón, los vasos sanguíneos pequeños tienen engrosada la capa media. El estudio del sistema inmune de la piel de los ratones PSGL-1^{-/-} mostraba un fenotipo inflamatorio y más activado que los ratones control, lo que refuerza la existencia de un síndrome autoinmune. Los ratones PSGL-1 KO presentaban además miopatía, problemas metabólicos y una mayor mortalidad. Nuestros resultados indican que los ratones PSGL-1^{-/-} desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmune progresiva cuyas manifestaciones clínicas son similares a la esclerosis sistémica (SSc). Por tanto, proponemos al ratón PSGL-1 KO como primer modelo murino de SSc.

También hemos estudiado la concentración de PSGL-1 y sus ligandos, las selectinas P, E y L, en el suero de los enfermos con SSc. Los resultados indican que los pacientes con SSc difusa tienen niveles elevados de PSGL-1 y las selectinas E y L, pero no se observan diferencias en la concentración de la selectina P. En el caso de la SSc limitada, no hay cambios en la concentración de PSGL-1 ni de la selectina L, mientras que la concentración de la selectina P está disminuída y la selectina E aumentada. Estos datos apuntan que PSGL-1 y sus ligandos podrían estar implicados de forma diferencial en el desarrollo de la SSc humana y sugieren que estas moléculas podrían ser utilizadas como dianas terapéuticas y/o diagnósticas en un futuro.

SUMMARY

The leukocyte receptor PSGL-1 is the ligand of P, E and L-selectins, and it is responsible for the initial contacts of leukocytes with, and their rolling on the endothelium previous to their extravasation to inflammation sites. In our laboratory we observed that from 3 months of age onwards, PSGL-1-deficient mice showed skin lesions on the back that appeared spontaneously.

Histological analysis of the skin showed that PSGL-1-deficient mice presented thickening of the dermis due to collagen accumulation, and a reduction in the number of dermal blood vessels, as it happens in human scleroderma. The serological analysis confirmed the presence of circulating autoantibodies involved in connective tissue autoimmune diseases. In addition, we found interstitial leukocytic infiltrates in the lung, characteristic of nonspecific interstitial pneumonia. We also found interstitial infiltrates in the kidney, as well as infarcted areas caused by ischemic events and a decrease in the renal function expressed as the increase of urea and creatinin in serum and the detection of proteins and blood in urine. In addition, small blood vessels had a thickened media layer both in lung and kidney. The skin immune system of PSGL-1^{-/-} mice had an inflammatory phenotype and was more activated than in control mice, further suggesting the presence of an autoimmune syndrome. Moreover, PSGL-1 KO mice presented myopathy, metabolic problems and increased mortality. Our results indicate that PSGL-1^{-/-} mice spontaneously develop a progressive autoimmune disease with clinical manifestations similar to systemic sclerosis (SSc). Therefore, we propose PSGL-1^{-/-} mice as the first murine model of SSc.

We have also studied the concentration of PSGL-1 and its ligands, P, E and L-selectins, in the serum of patients with SSc. Our results showed that patients with diffuse SSc had higher levels of PSGL-1, E- and L-selectins, without difference in P selectin concentration. In limited SSc, there were not changes in the concentration of PSGL-1 and L-selectin, while the concentration of P-selectin was decreased and E-selectin was raised. These data point out that PSGL-1 and its ligands may be involved, in a differential way, in the development of human SSc and suggest that these molecules could be used as therapeutic and/or diagnostic targets in the future.

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	7
ABREVIATURAS UTILIZADAS	15
INTRODUCCIÓN	
1. El receptor leucocitario PSGL-1	21
1.1 Localización cromosómica, estructura y expresión de PSGL-1	21
1.2 Ligandos de PSGL-1	22
1.3 Regulación de la expresión de PSGL-1	23
1.4 Señalización de PSGL-1	24
1.5 Función de PSGL-1 en la extravasación leucocitaria	24
1.6 Función reguladora de PSGL-1	25
2. La enfermedad autoinmune esclerodermia	26
2.1 Características de la esclerodermia	26
2.2 Posibles agentes causales	27
2.3 Clasificación	27
2.4 Órganos implicados	28
2.4.1 Afectación de la piel	28
2.4.2 Enfermedad pulmonar	29
2.4.3 Enfermedad renal	30
2.4.4 Vasculopatía	30
2.4.5 Afectación muscular	32
2.4.6 Afectación gastrointestinal	32

2.5 Células y moléculas implicadas en la esclerodermia	32
2.5.1 Células	32
2.5.2 Citoquinas	34
2.5.3 Anticuerpos	35
2.5.4 Otras moléculas	36
3. PSGL-1 y sus ligandos en la esclerodermia	37
4. Modelos animales de esclerodermia	39
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Modelo experimental	47
2. Ensayos para detectar, identificar y cuantificar autoanticuerpos en el suero del ratón	47
3. Cuantificación de moléculas solubles en el suero de pacientes	48
4. Análisis bioquímicos	48
5. Valoración del metabolismo	49
6. Análisis histológico	49
6.1 Clasificación de los tipos de colágeno	50
6.2 Valoración de la fibrosis en la dermis	50
6.3 Valoración de las alteraciones histológicas renales	51
6.4 Valoración de las alteraciones histológicas pulmonares	51
6.5 Evaluación de la alteración vascular	52
6.6 Evaluación de la alteración histológica muscular	53

7. Cuantificación del colágeno	53
8. Análisis del sistema inmune residente en la piel	53
9. Generación de macrófagos a partir de precursores de médula ósea	54
10. Análisis estadístico	54

RESULTADOS

1. Estudio del síndrome autoinmune desarrollado por el ratón deficiente para PSGL-1	59
1.1 Desarrollo de fibrosis en la piel	59
1.2 Generación de autoanticuerpos relacionados con enfermedades autoinmunes del sistema conectivo	65
1.3 Enfermedad renal en ratones que carecen de PSGL-1	67
1.4 Desarrollo de neumonía intersticial no específica	73
1.5 Vasculopatía en piel, riñón y pulmón	75
1.6 Miopatía y problemas metabólicos	79
1.7 Aumento en la tasa de mortalidad	82
1.8 Activación del sistema inmune en los ratones que carecen de PSGL-1	83
2. Estudio de PSGL-1 y sus ligandos en el suero de pacientes con esclerosis sistémica	87

DISCUSIÓN

1. La deficiencia de PSGL-1 en ratones desencadena un síndrome autoinmune similar a la esclerodermia.	93
---	----

1.1 Los ratones que carecen de PSGL-1 presentan alteraciones en piel, pulmón y riñón	93
1.2 Vasculopatía, miopatía y trastornos metabólicos en los ratones que carecen de PSGL-1	95
1.3 Los ratones PSGL-1 KO tienen el sistema inmune activado	97
2. Alteración de los niveles de PSGL-1 y selectinas en el suero de pacientes con esclerosis sistémica.	99
3. Carencia de modelos animales completos en ratón de la esclerosis sistémica	101
CONCLUSIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	109
ANEXO	127

ABREVIATURAS

APC: alofococianina

ARNm: ARN mensajero

AST: aspartato aminotransferasa

BSA: albúmina de suero bovino

CD162: cluster of differentiation 162

CK: creatina quinasa

CLA: antígeno linfocitario humano

CQ: citoquinas

CTGF: factor de crecimiento del tejido conectivo

DAB: 3,3'-diaminobencidina

DC: células dendríticas

dcSSc: esclerosis sistémica cutánea difusa

DE: desviación estándar

dsDNA: ADN de doble cadena

EEM: error estándar de la media

EIP: enfermedad intersticial pulmonar

ERK1/2: extracellular-signal-regulated kinases 1 and 2

ERM: ezrina-radixina-moesina

FCS: suero de ternera fetal

FITC: isotiocianato de fluoresceína

Fli1: Friend leukaemia integration 1

Fra-2: Fos-related antigen-2

g: gramos

HAP: hipertensión arterial pulmonar

HE: hematoxilina y eosina

HEp-2: Human Epidermoid carcinoma strain 2

HRP: horseradish peroxidase, peroxidasa de rábano

IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN γ : interferón gamma

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleuquina

IMF: intensidad media de fluorescencia

ITAM: immunoreceptor tyrosine-base activation motif

Jo-1: autoanticuerpo contra la histidil-ARNt-sintetasa

kDa: kiloDalton

KLF5: Krüppel-like factor 5

lcSSc: esclerosis sistémica cutánea limitada

LES: lupus eritematoso sistémico

LPS: lipopolisacárido

M.O. : médula ósea

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad II

NINE: neumonía intersticial no específica

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR: receptor de PDGF

PE: ficoeritrina

PE-Cy7: tándem de ficoeritrina y cianina

PerCP: complejo proteína peridinina-clorofila

PSGL-1 KO: deficiente para PSGL-1

PSGL-1^{-/-}: deficiente para PSGL-1

PSGL-1: glicoproteína ligando 1 de la selectina P

ROS: especies reactivas del oxígeno

Scl-70: autoanticuerpo contra la ADN topoisomerasa I

sE-sel: selectina E soluble

sL-sel: selectina L soluble

Sm: autoanticuerpo contra el antígeno Smith

SMA: actina de músculo liso

sP-sel: selectina P soluble

sPSGL-1: PSGL-1 soluble

SRE: elemento de respuesta al suero

SSA/Ro: autoanticuerpo contra dos ribonucleoproteínas de 52 y 60 kDa

Syk: spleen tyrosine kinase

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

Th/To: autoanticuerpo contra un complejo de proteínas y ARN (RNasa MRP)

Th1: linfocito T cooperador (helper) tipo 1

Th17: linfocito T cooperador (helper) tipo 17

Th2: linfocito T cooperador (helper) tipo 2

Th22: linfocito T cooperador (helper) tipo 22

TLR: toll-like receptor

TM: tricrómico de Masson

TPST: tyrosylprotein sulfotransferasa

Treg: linfocito T regulador

Tsk: tight skin

U1-RNP: autoanticuerpo contra el complejo ribonucleoproteico U1

U3-RNP: autoanticuerpo contra la ribonucleoproteína fibrilarina

WT: wild-type, silvestre, control

INTRODUCCIÓN

1. El receptor leucocitario PSGL-1

1.1 Localización cromosómica, estructura y expresión de PSGL-1

El gen que codifica para PSGL-1 (glicoproteína ligando 1 de la selectina P) se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 humano y en el cromosoma 5 del ratón. Su región codificante se encuentra en un único exón, y la similitud entre los genes humano y de ratón es del 67% (Veldman et al., 1995; Yang et al., 1996).

La molécula PSGL-1 es también conocida como CD162, según la nomenclatura CD (Davenpeck et al., 2000). PSGL-1 es una proteína altamente glicosilada que pertenece a la familia de las sialomucinas (Walcheck et al., 1996) y cuya estructura es un homodímero de 220 kD compuesto por dos subunidades de 120 kDa unidas por un puente disulfuro (Fig. 1). Cada monómero contiene 402 aminoácidos y se compone de un dominio extracelular altamente glicosilado que interacciona con los ligandos, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico de señalización. Los glicanos se unen a la proteína a través del oxígeno y del nitrógeno (enlaces O-glucosídicos y N-glucosídicos), contienen los glúcidos poli-N-lactosamina, fucosa y ácido siálico, y terminan en el tetrasacárido sialil-Lewis X. Además la proteína contiene tirosinas sulfatadas en los residuos 46, 48 y 51, que son necesarios para la interacción con la selectina P (Blann et al., 2003b; Spertini et al., 2012; Spertini et al., 1996; Vachino et al., 1995). En la región extracelular hay una serie de repeticiones de 10 aminoácidos ricas en serina, treonina y prolina, características de los dominios tipo mucina. El número de repeticiones es de 10 en el caso del ratón y de 15 en el ser humano (Yang et al., 1996).

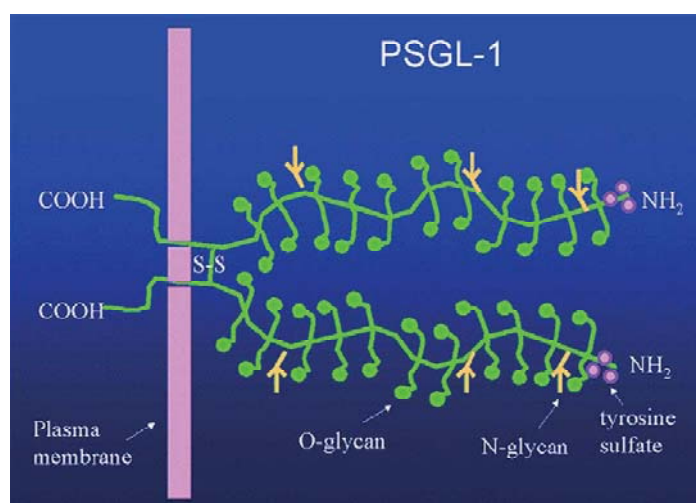


Fig. 1 Estructura de PSGL-1. Los dominios extracelulares se encuentran altamente glicosilados para su unión a las selectinas. Imagen tomada de Blann et al., 2003a

PSGL-1 se expresa constitutivamente en todos los leucocitos y en plaquetas (Frenette et al., 2000; Laszik et al., 1996). También se ha detectado su presencia en el epitelio de las trompas de Falopio (Laszik et al., 1996), en algunas células endoteliales como las de vena umbilical y las microvasculares de prepucio, en el endotelio de arterias coronarias ateroscleróticas (da Costa Martins et al., 2007) y, en un modelo experimental de ileítis crónica en ratón, en endotelio de vénulas de ganglios linfáticos mesentéricos e intestino delgado (Rivera-Nieves et al., 2006). PSGL-1 es el principal ligando fisiológico de la selectina P y, aunque la activación de los leucocitos y el endotelio no altera sustancialmente la expresión de PSGL-1, induce la capacidad funcional de PSGL-1 de unir ligando en los linfocitos mediante cambios post-traduccionales en su glicosilación que dependen de la enzima tyrosylprotein sulfotransferasa (TPST) (Ouyang et al., 1998; Sperandio, 2006; Vachino et al., 1995; Westmuckett et al., 2011; Zarbock et al., 2011) así como de glicosiltransferasas (Carlow et al., 2009; Martinez et al., 2005; Ni and Walcheck, 2009). Sin embargo, la activación de las plaquetas con trombina y la maduración de las células dendríticas con LPS incrementa la expresión de PSGL-1 en su superficie (Frenette et al., 2000; Urzainqui et al., 2007). Además, hay que destacar que, en las células no activadas, PSGL-1 se localiza en la membrana por toda la superficie celular, pero tras la activación se relocaliza y concentra principalmente en el urópodo (Lorant et al., 1995; Serrador et al., 2002).

1.2 Ligandos de PSGL-1

Aunque las selectinas son sus ligandos más estudiados, PSGL-1 también interacciona con las quimioquinas CCL19, CCL21 y CCL27 (Hirata et al., 2004; Veerman et al., 2007), con las proteasas ADAM8 y ADAM28, (Dominguez-Luis et al 2010; Shimoda M et al 2007 JBC) y con patógenos como el enterovirus EV71 (Patel and Bergelson, 2009). Respecto a la interacción PSGL-1/selectina, se ha demostrado que PSGL-1 se une al dominio lectina de las selectinas P, E y L en una reacción dependiente de calcio (Spertini et al., 1996), siendo la selectina P la que une con la mayor afinidad a PSGL-1 (da Costa Martins et al., 2007). La selectina L se expresa constitutivamente en la membrana de los leucocitos; la selectina P se almacena en los gránulos de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, y es transportado a la membrana tras su activación; la selectina E se expresa en el endotelio activado (Ates et al., 2004). La unión de la PSGL-1 leucocitaria a las

selectinas E y P endoteliales permite la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular previa a su extravasación, mientras las interacciones entre leucocitos mediadas por la selectina L incrementan el reclutamiento de leucocitos hacia los puntos de infección o inflamación (Walcheck et al., 1996). Se ha observado que la PSGL-1 endotelial media la interacción con las selectinas de monocitos y complejos monocito-plaqueta en un modelo de flujo (da Costa Martins et al., 2007), mientras que la PSGL-1 de plaquetas y leucocitos promueve la interacción con las selectinas E y P del endotelio activado (Frenette et al., 2000). Los leucocitos polimorfonucleares, monocitos y células dendríticas inmaduras son capaces de unir selectina P sin ser previamente activados (Julien et al., 2007; Lorant et al., 1995; Robert et al., 1999), mientras que, sólo algunas subpoblaciones de linfocitos T y NK, que representan un 10% de los linfocitos, son capaces de interactuar con la selectina P, ya que el resto de ellos y los linfocitos B presentan una forma no funcional de PSGL-1 (Moore and Thompson, 1992; Postigo et al., 1994; Serrador et al., 2002; Vachino et al., 1995).

1.3 Regulación de la expresión de PSGL-1

Además de la sulfatación en tirosina y las glicosilaciones, necesarias para su unión a las selectinas, se ha descrito que la metaloproteasa ADAM-8, implicada en el desarrollo de algunas enfermedades inflamatorias como el asma, se asocia con PSGL-1 a través de las proteínas ERM. Puesto que ADAM-8 corta proteolíticamente a PSGL-1, podría estar controlando su expresión en la membrana celular, ya que se ha visto que la incubación de células con ADAM-8 activada disminuía el rodamiento celular sobre la selectina P (Domínguez-Luis et al., 2011). Asimismo, se ha descrito que la unión de PSGL-1 a la metaloproteasa ADAM28 aumenta su adhesión a la selectina P de las células endoteliales (Shimoda et al., 2007) y que PSGL-1 es sustrato de la proteasa BACE-1 (Lichtenthaler et al., 2003). Además de la regulación de la expresión mediada por proteasas, también se regula la capacidad de interacción de PSGL-1 con las selectinas mediante la modificación de sus glúcidos, como es el caso del glicano 6-Sulfo-LacNac, también conocido como M-DC8 o SLAN. La presencia de este glúcido impide la unión a la selectina P y caracteriza a una población de células dendríticas pro-inflamatorias que se han denominado SLAN-DC, las cuales se han encontrado incrementadas en lesiones de piel psoriática, sugiriendo un papel regulador de la inflamación para PSGL-1 (Hänsel et al., 2011; Schäkel et al., 2002).

1.4 Señalización de PSGL-1

Además de su interacción con ligandos extracelulares, PSGL-1 actúa también como molécula de señalización intracelular. Se ha descrito que la unión de PSGL-1 a sus ligandos induce un aumento general de la fosforilación celular y la activación de las MAP kinasas en neutrófilos humanos (Hidari et al., 1997) y la liberación de citocinas en neutrófilos, monocitos y linfocitos T (Celi et al., 1994; Damle et al., 1992; Weyrich et al., 1996; Weyrich et al., 1995). En nuestro laboratorio describimos que el dominio citoplásmico de PSGL-1 se asocia con la tiosina quinasa Syk a través de las proteínas adaptadoras ezrina y moesina, pertenecientes a la familia de las ERMs, y que la interacción de PSGL-1 con su ligando desencadena la fosforilación de Syk y la activación transcripcional dependiente de SRE, conduciendo a la activación de la transcripción del gen c-fos (Urzainqui et al., 2002). Posteriormente se demostró que Syk es necesaria para el rodamiento sobre la selectina P (Abbal et al., 2006) y para la activación de la integrina $\alpha_L\beta_2$ y el denominado “rodamiento lento” (Zarbock et al., 2007). Recientemente se ha descrito la señalización del complejo PSGL1/L-sel a través de la familia Src y la activación de la integrina β_1 a través de p85 (Stadtman et al. 2013; Luo et al. 2013). Además, se ha demostrado que en células de Langerhans derivadas de monocitos de donantes humanos sanos, la interacción PSGL-1/selectina P aumenta la transcripción de los genes TGF- β , IL-10 e IDO y reduce la expresión en su membrana de MHCII y moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) desencadenando así un programa de tolerancia que induce la diferenciación de las células T naïve hacia células T reguladoras (Urzainqui et al., 2007).

1.5 Función de PSGL-1 en la extravasación leucocitaria

PSGL-1 es el receptor de adhesión leucocitario responsable de las interacciones iniciales de los leucocitos con las células endoteliales activadas y de su rodamiento sobre el endotelio vascular, que son los primeros pasos del proceso de extravasación hacia el foco de inflamación o infección, durante una reacción inflamatoria (Fig. 2). En este sentido, se ha visto que la deficiencia de PSGL-1 reducía considerablemente la interacción de monocitos con el endotelio aterosclerótico (An et al., 2008; Ley et al., 2007).

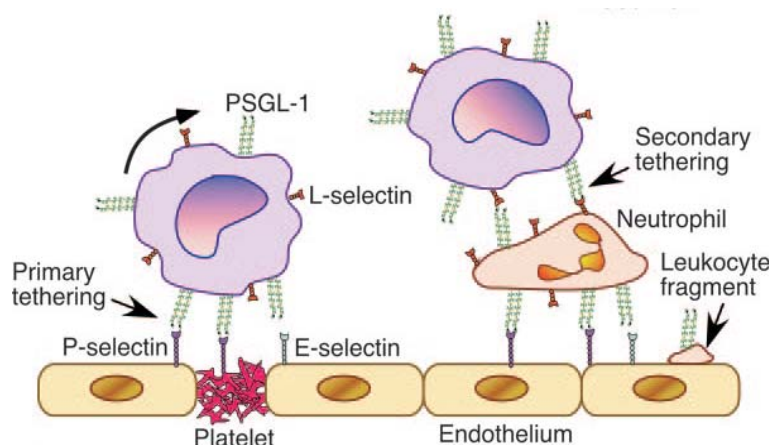


Fig. 2 El rodamiento de los leucocitos sobre las selectinas E y P del endotelio y plaquetas activadas se produce por la interacción con la PSGL-1 leucocitaria. El rodamiento secundario de leucocitos sobre otros leucocitos está mediado por la unión de PSGL-1 a la selectina L. Imagen tomada de An et al., 2008

La molécula PSGL-1 también es importante para la entrada de leucocitos en diferentes tejidos y órganos durante la recirculación del sistema inmune en condiciones homeostáticas. Concretamente, la modificación glucídica de PSGL-1 conocida como Antígeno Linfocitario Cutáneo (CLA) es necesaria para el reclutamiento de los leucocitos hacia la piel y les confiere la capacidad de unirse a la selectina E. El CLA se ha detectado en linfocitos T de memoria, neutrófilos, monocitos y en células dendríticas cultivadas a partir de precursores sanguíneos (Fuhlbrigge et al., 1997; Kieffer et al., 2001). Por otro lado, el reclutamiento de los progenitores de los linfocitos T en el timo se sirve de la interacción de la PSGL-1 leucocitaria con la selectina P del endotelio tímico, siendo la expresión de la selectina P proporcional a la disponibilidad de nichos estromales (Rossi et al., 2005). Asimismo, PSGL-1 es el responsable del reclutamiento de los leucocitos a la médula ósea (Frenette et al., 1998) y participa en su reclutamiento a nivel de colon (Nuñez-Andrade et al., 2011). Además, los linfocitos T pero no los B utilizan PSGL-1 para unirse a las quimioquinas CCL19 y CCL21 en su entrada a los órganos linfoides secundarios, de forma independiente de las selectinas (Veerman et al., 2007).

1.6 Función reguladora de PSGL-1

Además de su papel como receptor de adhesión, PSGL-1 también podría estar implicada en la regulación del sistema inmune. En varios estudios se ha relacionado la

ausencia de selectina P o de PSGL-1 con enfermedad exacerbada en distintos modelos animales, como la glomerulonefritis en ratones susceptibles al lupus, la esclerodermia inducida por bleomicina, la colitis ulcerosa inducida por DSS, la artritis inducida por colágeno y la encefalomiелitis autoinmune experimental (Angiari et al., 2013; Bullard et al., 1999; He et al., 2006; Nuñez-Andrade et al., 2011; Yoshizaki et al., 2010). En relación con la enfermedad humana, se han encontrado niveles elevados de PSGL-1 soluble en pacientes con esclerodermia (Yanaba et al., 2004) y colitis ulcerosa (Ajdukovic et al., 2015), y se ha descrito recientemente que las células dendríticas derivadas de monocitos aislados de pacientes con lupus eritematoso sistémico son incapaces de generar células T reguladoras tras la interacción con la selectina P (Estrada-Capetillo et al., 2013).

Trabajos previos realizados en nuestro grupo han demostrado que PSGL-1 modula la función de las células dendríticas (DC) tanto humanas como murinas. Por un lado, las DC derivadas de monocitos de donantes humanos sanos tratadas con selectina P, adquirirían un fenotipo de tolerancia que las capacitaba para generar linfocitos T reguladores. Por otro lado, los ratones deficientes para PSGL-1 producían menos células T CD4⁺ reguladoras naturales en el timo y sus DC eran más inmunogénicas, con mayor expresión de HLA-DR y moléculas coestimuladoras (CD40, CD86) (Urzainqui et al., 2007). En un modelo de colitis crónica inducida por Sulfato Dextrano de Sodio (DSS), los ratones PSGL-1 KO desarrollaban la colitis antes y con mayor gravedad que los control. Además, antes del tratamiento con DSS el sistema inmune basal de la “lamina propria” colónica de los ratones PSGL-1^{-/-} ya se encontraba en un estado de mayor activación, en cuanto a células dendríticas, macrófagos y linfocitos T (Nuñez-Andrade et al., 2011). En conjunto, estos resultados sugerían que PSGL-1 podría tener una importante función reguladora de la homeostasis del sistema inmune.

2. La enfermedad autoinmune esclerodermia

2.1 Características de la esclerodermia

La esclerodermia es una enfermedad autoinmune del tejido conectivo infrecuente que afecta principalmente a mujeres (3-14 mujeres: 1 hombre) con pico en torno a los 50 años de edad (Mayes, 2003). Tiene una prevalencia de 10/100.000 habitantes

(Sticherling, 2012), aunque la prevalencia más alta se encuentra en la tribu Choctaw de Oklahoma (Roberts et al., 2002). La esclerodermia se caracteriza por fibrosis extensa de la piel y órganos internos, vasculopatía de vasos pequeños, y activación inmunológica con producción de autoanticuerpos específicos de dicha enfermedad (Barnes and Mayes, 2012). Su diagnóstico es directo una vez establecida la enfermedad, pero es difícil hacer un diagnóstico temprano y actualmente no hay terapia que consiga su remisión (Opitz et al., 2011). Las principales causas de muerte son la hipertensión arterial pulmonar (HAP) y la enfermedad intersticial pulmonar (EIP) (Gutsche et al., 2012). Otras causas de mortalidad son las arritmias cardíacas y la crisis renal aguda (Barnes and Mayes, 2012).

2.2 Posibles agentes causales

Varios factores están implicados en el desarrollo de la esclerodermia, como factores genéticos, químicos-medioambientales o agentes infecciosos. En cuanto a la susceptibilidad genética, se ha detectado mayor riesgo al desarrollo de la enfermedad en los miembros de la misma familia aunque con baja concordancia entre hermanos gemelos (tasa 4.2%), por lo que es muy probable que la regulación epigenética se deba a procesos al azar (Roberts-Thomson and Walker, 2012). Dentro de los agentes químicos relacionados con el riesgo a padecer esclerodermia encontramos la exposición a sílice, solventes, cloruro de vinilo, aceite tóxico, gadolinio, bleomicina y pentazocina (Barnes and Mayes, 2012). También la infección previa de ciertos virus y bacterias se ha descrito como un factor de riesgo en la aparición de esclerodermia (Grossman et al., 2011). Por otro lado, se ha observado que algunos pacientes con enfermedad grave han mejorado con el trasplante autólogo de médula ósea (Henes et al., 2012; Passweg and Tyndall, 2007), sugiriendo un papel del sistema inmune en el inicio de la enfermedad.

2.3 Clasificación

Clínicamente es posible dividir la esclerodermia en dos formas de presentación: una de tipo localizada y otra de tipo sistémica. En la primera, la afectación se restringe a la piel y tejidos subcutáneos e incluye desórdenes como la morfea y la esclerodermia linear. Por su parte, la forma cutánea sistémica de esclerodermia, habitualmente conocida como esclerosis sistémica (SSc), afecta tanto a la piel como a órganos internos (Díaz and Guzmán, 2009). También existe una forma muy rara de esclerodermia

sistémica, “sine esclerodermia”, sin cambios de esclerosis en la piel que afecta al 5% de los pacientes (Hinchcliff and Varga, 2008).

Los dos subtipos más comunes de SSc son la forma cutánea limitada (lcSSc) que incluye al 60% de los pacientes y la forma cutánea difusa (dcSSc) que incluye al 35% (Hinchcliff and Varga, 2008). En la lcSSc, la fibrosis abarca las zonas distales de las extremidades y la cara. La hipertensión pulmonar es frecuente, se detectan anticuerpos anti-centrómero (Gabrielli et al., 2009), y es raro que se produzca afectación de órganos internos (Bussone and Mouthon, 2011). En la dcSSc, el engrosamiento de la piel se localiza en la parte superior de los brazos, los muslos y el torso además de en las zonas distales y la cara (Mayes, 2003). Se asocia con mayor gravedad y daño de órganos internos (Barnes and Mayes, 2012) y la presencia del anticuerpo anti-topoisomerasa I o anti Scl-70 (Gabrielli et al., 2009).

2.4 Órganos implicados

2.4.1 Afectación de la piel

La esclerodermia se caracteriza por una fibrosis extensa de la dermis, con reducción de la celularidad y un gran depósito de colágeno (Bhattacharyya et al., 2011) (Fig. 3). La fibrosis gradualmente reemplaza a la fase inflamatoria (Díaz and Guzmán, 2009), y progresivamente el tejido adiposo subyacente también resulta afectado por la fibrosis (Wei et al., 2011). Se acumula el colágeno de tipo I (Gabrielli et al., 2009), cuyas fibras se encuentran más compactadas de lo normal (Cutolo et al., 2010). El 50% de los pacientes con esclerodermia sufren úlceras digitales en manos y pies (Guiducci et al., 2007). También se ha descrito la presencia de úlceras no digitales en la región pretibial de piernas, tobillos, codos y antepies, generalmente por roce o de origen microtraumático. En ellas se produce una destrucción tisular que en los casos más graves puede alcanzar el nivel del hueso. Asimismo, es frecuente la presencia de infiltración inflamatoria en el área perilesional (Amanzi et al., 2010).

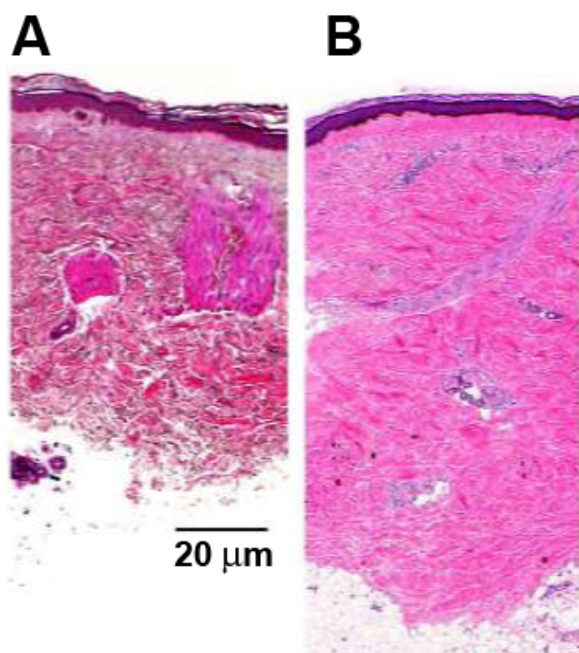


Fig 3 Biopsias de piel del brazo de un sujeto sano (A) y de un paciente con esclerosis sistémica difusa (B) teñidas con Hematoxilina/Eosina (H/E). Imagen modificada de Hinchcliff et al., 2013.

2.4.2 Enfermedad pulmonar

La enfermedad pulmonar en la SSc comprende principalmente la HAP y la EIP, ambas pueden presentarse aisladas o asociadas, aunque esta asociación es más común en los enfermos de dcSSc. La prevalencia de la HAP en la SSc está en torno al 10-12 %, y la HAP no asociada a EIP es más frecuente en los pacientes con el subtipo limitado que en el difuso (Shahane, 2013). Por el contrario, la EIP es más frecuente en los pacientes de dcSSc, y afecta al 75% de los pacientes de SSc (Bussone and Mouthon, 2011).

Los pulmones de los pacientes de esclerodermia afectados por la EIP típicamente presentan neumonía intersticial no específica (NINE) en la mayoría de los casos (76%) (Bussone and Mouthon, 2011). De éstos, la mayoría presentan NINE fibrótica, caracterizada por fibrosis intersticial asociada con infiltrados inflamatorios pequeños (Fig. 4). Sin embargo, un 10% de estos pacientes carecen de fibrosis pulmonar, manifestando NINE a nivel celular (Herzog et al., 2014). La fibrosis pulmonar puede conducir a la compresión de la vasculatura pulmonar incrementando la resistencia vascular de forma secundaria (Shahane, 2013). Los pacientes con HAP pueden presentar enfermedad pulmonar venooclusiva, que se caracteriza por proliferación de la íntima y fibrosis de las venas pulmonares (Le Pavec et al., 2010).

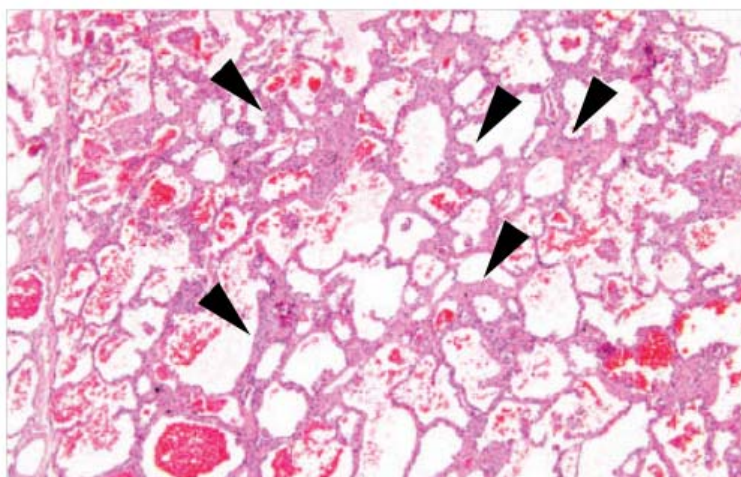


Fig. 4 Microfotografía de pulmón (40x) que muestra neumonía intersticial no específica, en la que los septos alveolares se encuentran engrosados (puntas de flecha). Imagen modificada de Herzog et al., 2014.

2.4.3 Enfermedad renal

La afectación renal se manifiesta clínicamente en alrededor del 30% de los pacientes de SSc (Sticherling, 2012) pero es responsable de sólo el 8% de las muertes producidas (Guiducci et al., 2007). La manifestación más grave de enfermedad renal es la crisis renal, que comúnmente se manifiesta como hipertensión y fallo renal progresivo (Caron et al., 2012), afectando al 5-10% de todos los pacientes de SSc (Rabquer and Koch, 2012). El fallo renal se manifiesta por la presencia de proteinuria y hematuria microscópica (Hinchcliff and Varga, 2008; Roberts et al., 2002). La hiperplasia de la capa íntima de las arterias resulta en isquemia renal que activa el sistema renina-angiotensina causando hipertensión severa y resistente al tratamiento convencional. Además, se produce un proceso fibrótico que acaba en nefroesclerosis, en la cual el tejido renal va siendo sustituido por colágeno (Batal et al., 2009; Cutolo et al., 2010; Sticherling, 2012). Para evaluar la función renal, es aconsejable la medición de electrolitos, urea y creatinina en sangre (Roberts et al., 2002).

2.4.4 Vasculopatía

La SSc es una enfermedad multiorgánica que se caracteriza por un daño extenso de la microvasculatura, que afecta a piel, pulmones, riñones, corazón y tracto gastrointestinal (Guiducci et al., 2007). En este sentido, en la piel de los pacientes esclerodérmicos se produce una reducción en la densidad de los capilares, los cuales

además presentan una organización irregular (Distler et al., 2006). Se estima que el número de capilares normales se reduce al 20% en pacientes con SSc activa (Cutolo et al., 2010). Estos cambios dificultan el flujo de la sangre en los tejidos causando falta de nutrientes e hipoxia, lo que se manifiesta clínicamente en forma de úlceras cutáneas (Distler et al., 2006). El flujo sanguíneo reducido induce una angiogénesis compensadora en la piel que habitualmente resulta ser insuficiente (Guiducci et al., 2007). La vasculopatía afecta a todas las capas de la pared del vaso (Fig. 5), con hiperplasia fibrótica concéntrica de la capa íntima, fibrosis de la capa adventicia e hipertrofia de las células musculares lisas de la capa media, que conllevan la oclusión del lumen y facilitan las trombosis. Estos cambios estructurales se han descrito en vasos digitales, pulmonares y renales (Batal et al., 2009; Cipriani et al., 2011; Steen et al., 2009; Trojanowska, 2010). Otros cambios vasculares presentes en esta enfermedad consisten en la formación de megacapilares, áreas avasculares (Guiducci et al., 2007) y microhemorragias (Cutolo et al., 2010). En cuanto a las manifestaciones clínicas, además de la presencia de úlceras se pueden producir el fenómeno de Raynaud, la crisis renal y la HAP (Rabquer and Koch, 2012).

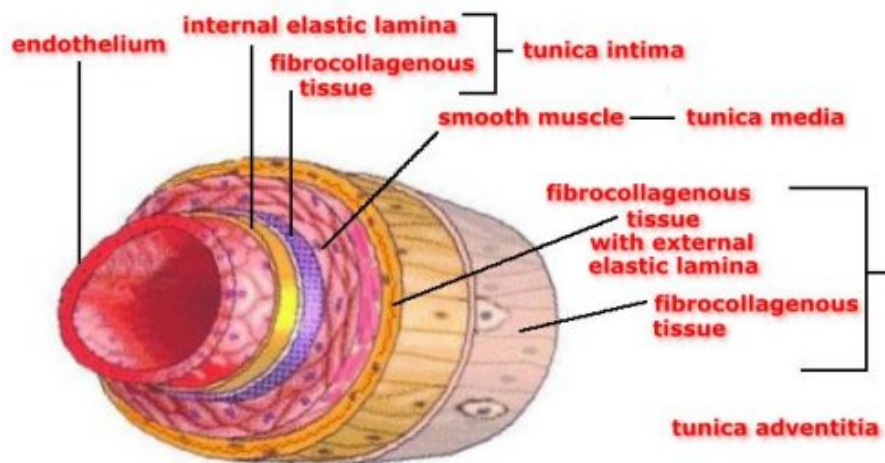


Fig. 5 Esquema de las capas de un vaso sanguíneo. La túnica media está formada por músculo liso, mientras las tunicas íntima y adventicia por tejido fibroso. Imagen tomada de <http://fau.pearlashes.com/anatomy/Chapter%2032/Chapter%2032.htm>
Anatomy and Physiology labs. Florida Atlantic University

2.4.5 Afectación muscular

La miopatía es común en la SSc, donde el daño muscular frecuentemente correlaciona con la implicación del miocardio. Estas complicaciones son más prevalentes en hombres y en la forma dcSSc. La inflamación en el corazón disminuye la microcirculación en el 10-50% de los pacientes y causa fibrosis en el miocardio, lo que puede conducir a disfunción cardíaca y arritmias o anormalidades en la conducción (Chaisson and Hassoun, 2013; Le Pavec et al., 2010).

Histológicamente, en algunos pacientes se puede detectar fibrosis intersticial, inflamación y microangiopatía del endomisio. El daño muscular se manifiesta como debilidad de los músculos proximales y aumento de las enzimas creatina quinasa (CK) y aspartato transferasa (AST) en sangre, con una frecuencia variable según los grupos de pacientes estudiados (Furst et al., 2001; Ranque et al., 2007; Toledano et al., 2012).

2.4.6 Afectación gastrointestinal

La esclerodermia afecta al tracto gastrointestinal del 90% de los pacientes, aunque la expresión clínica es muy variable ya que este trastorno se puede presentar a lo largo de todo su trayecto. Es muy común la disfagia causada por la falta de motilidad del esófago. Menos frecuente es la afectación del intestino delgado, donde la atrofia del músculo liso puede causar problemas de malabsorción que conllevan desnutrición y pérdida de peso (Adnan, 2008; Ortiz-Santamaria et al., 2014; Roberts et al., 2002). En los pacientes que presentan signos de malnutrición o malabsorción debería valorarse el nivel de albúmina en sangre (Roberts et al., 2002).

2.5 Células y moléculas implicadas en la esclerodermia

2.5.1 Células

En las lesiones tempranas de la enfermedad, hay apoptosis de las células endoteliales o cambios en su fenotipo, además de ausencia de proliferación endotelial y de diferenciación a partir de precursores. La movilización de los precursores endoteliales se ha relacionado con la gravedad de la enfermedad, aunque no se ha demostrado su reclutamiento en la vasculatura periférica (Allanore et al., 2007; Gabrielli et al., 2009). Los vasos sanguíneos pequeños contienen células musculares

lisas y pericitos. Los pericitos tienen el potencial de diferenciarse en células musculares lisas vasculares, fibroblastos y miofibroblastos (células contráctiles que expresan actina α de músculo liso) y de influir en la proliferación de la célula endotelial. En pacientes de SSc los pericitos son hiperplásicos y están activados, por lo que también podrían contribuir a la sobreproducción de matriz extracelular (Abraham et al., 2009). El aumento del grosor de la pared vascular causado por la proliferación de células musculares lisas indica que estas células están respondiendo al daño inducido por la esclerodermia (Gabrielli et al., 2009). Los fibroblastos dirigen la producción, depósito y remodelación del colágeno y otros componentes de la matriz extracelular y sobreexpresan diversas citoquinas, como el TGF- β y su receptor, y la MCP-1, que contribuyen al mantenimiento de la reacción fibrótica (Gabrielli et al., 2009). Los miofibroblastos activados juegan un papel importante en el desarrollo de la fibrosis pulmonar. Estos miofibroblastos pueden transdiferenciarse a partir de diversos tipos celulares como los fibrocitos derivados de médula ósea, células epiteliales, células endoteliales, adipocitos y pericitos (Herzog et al., 2014).

Los infiltrados celulares en las lesiones tempranas de esclerodermia consisten mayoritariamente en células T, macrófagos, células B y mastocitos. En pacientes de SSc se han encontrado niveles de células T CD4⁺ y CD8⁺ circulantes significativamente más altos que en controles sanos (Grossman et al., 2011) y una proporción CD4/CD8 aumentada tanto en la sangre como en la piel, pero disminuida en el fluido del lavado broncoalveolar (Hussein et al., 2005). Los pacientes con SSc tienen elevados niveles de linfocitos T CD4⁺ Th2 que presentan marcadores de activación (Gabrielli et al., 2009; Stummvoll et al., 2004) y además muestran también un mayor número de linfocitos Th17 en la piel, los pulmones y circulantes en sangre periférica (Bhattacharyya et al., 2011; Liu et al., 2013) y un aumento de los Th22 (en la dcSSc) que se relaciona con la presencia de EIP (Truchetet et al., 2011). Por otro lado, Valentini detectó un aumento de las células mononucleares productoras de IFN γ en el 50% de pacientes con SSc, en los cuales la activación Th1 podía presentarse sola o coexistiendo con la Th2 (Valentini et al., 2001). La presencia conjunta de las respuestas Th1 y Th2 también se ha detectado en pacientes de otra enfermedad autoinmune, el lupus eritematoso sistémico (LES) (Lit et al., 2007). Respecto a los linfocitos B, contribuyen a la patogénesis de la fibrosis secretando interleuquina 6 (IL-6) y TGF- β , además de producir autoanticuerpos (Francois et al., 2013; Gabrielli et al., 2009). Estudios mediante análisis de expresión

génica de lesiones de pieles esclerodérmicas han revelado una sobreexpresión de genes relacionados con los linfocitos B, como CD19, indicando una mayor actividad de estas células, que tienen una capacidad aumentada de producir IgG e IL-6 (Hasegawa, 2010). Además, la hipergammaglobulinemia es característica en los enfermos de SSc (Díaz and Guzmán, 2009).

Los macrófagos también contribuyen al proceso de fibrosis secretando factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF- β (Lafyatis and York, 2009) y se han detectado niveles elevados en suero de factores inductores de la diferenciación de los macrófagos hacia un fenotipo M2, así como marcadores de activación de los mismos y se han asociado con fibrosis pulmonar y con EIP (Manetti, 2015). En la etapa temprana de la lesión cutánea, los mastocitos se degranulan frecuentemente, lo que determina la proliferación de los fibroblastos y la diferenciación de los miofibroblastos, ya que los mastocitos producen IL-4 y TGF- β (Díaz and Guzmán, 2009; Yamamoto, 2010). Por otra parte, se han encontrado altos niveles de eosinófilos en la piel, la sangre y el fluido del lavado broncoalveolar de pacientes esclerodérmicos. Estos eosinófilos podrían contribuir a la fibrosis pulmonar y de la piel produciendo varias citoquinas profibrogénicas (Hussein et al., 2005).

2.5.2 Citoquinas

En la fase inflamatoria de la SSc predominan los linfocitos Th2 activados, que presentan marcadores de activación como el receptor de IL-2, y sobreexpresan factores profibróticos como la IL-4, IL-13, IL17, TGF- β , PDGF, MCP-1 y el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (Díaz and Guzmán, 2009). En el suero de los pacientes se han detectado niveles elevados de moléculas implicadas en inflamación y fibrosis como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-23 y TNF α (Abraham et al., 2009; Radstake et al., 2009; Sticherling, 2012). Las interleuquinas IL-4, IL-6 e IL-13 son capaces de estimular la síntesis de colágeno (Baraut et al., 2010). MCP-1 también se ha encontrado aumentada en la piel y en los fibroblastos de pacientes con esclerodermia (Bhattacharyya et al., 2011). Análisis de expresión génica han mostrado que dentro de los pacientes con SSc, los linfocitos T CD8⁺ intraalveolares sintetizan IL-4 solo en aquellos con EIP (Bussone and Mouthon, 2011). Se ha visto que los macrófagos alveolares de pacientes de SSc con fibrosis pulmonar producen IL-13, y se encuentra elevada en el suero de los pacientes (Lafyatis and York, 2009).

Además de la respuesta Th2, la Th17 también está implicada en el desarrollo de fibrosis. Se ha descrito que la IL-17A induce la producción de IL-6 e IL-8 y la expresión de ICAM-1 en fibroblastos humanos, mientras la IL-17F induce la producción de TGF- β por las células endoteliales. Se ha visto que los pacientes afectados por enfermedad pulmonar presentan un incremento de la IL-17 en suero y en el fluido del lavado broncoalveolar (Chizzolini et al., 2011). Además se ha descrito que los linfocitos T de pacientes con SSc secretaban más IL-17 e IFN γ (Radstake et al., 2009), y que aumentaba la expresión de interferón en la piel lesional (Wei et al., 2011).

En los pacientes con SSc se han encontrado niveles mayores de los mediadores inflamatorios IL-1 β y TNF α en el fluido del lavado broncoalveolar, la sangre y las lesiones de la piel (Hussein et al., 2005). En cuanto al TGF- β , es una potente citoquina profibrótica cuyo nivel de activación en fibroblastos de la piel se ha correlacionado con la gravedad de la SSc (Baraut et al., 2010).

2.5.3 Anticuerpos

La mayoría (90%) de los pacientes con SSc presentan anticuerpos antinucleares (Bussone and Mouthon, 2011). El patrón nuclear moteado (Fig. 6A) se detecta en el 30% de los pacientes con esclerosis sistémica difusa y sugiere la presencia de anticuerpos anti-topoisomerasa I (Scl-70). Un patrón caracterizado por el agrupamiento de los nucléolos es altamente específico de la esclerodermia difusa, ocurriendo en el 5% de los pacientes. El patrón anti-centrómero (Fig. 6B) se detecta en el 70-80% de pacientes con esclerodermia sistémica limitada y se asocia con alto riesgo de hipertensión pulmonar (Gabrielli et al., 2009) pero baja mortalidad (Nihtyanova and Denton, 2010). Generalmente los anticuerpos anti-Scl-70 y anti-centrómero son excluyentes entre sí (Navarro, 2006). También se han detectado otros autoanticuerpos en enfermos con esclerodermia, como los anticuerpos Th/To contra el complejo RNasa MRP que son anticuerpos nucleolares que aparecen en la lcSSc y se asocian con HAP y EIP (Bussone and Mouthon, 2011), y el anti-RNA polimerasa III, que se asocia con el subtipo difuso y la crisis renal (Gutsche et al., 2012). La presencia de anticuerpos anti-U1-RNP se asocia generalmente con síndromes de solapamiento entre enfermedades del tejido conectivo (Nihtyanova and Denton, 2010), pero una alta concentración de anticuerpos anti-U1-RNP es diagnóstico de la enfermedad mixta del tejido conectivo

(Migliorini et al., 2005). El 6% de los pacientes con SSc presentan anticuerpos anti-U1-RNP y se asocian con el subtipo limitado, en cambio los anticuerpos anti-U3-RNP se asocian con el subtipo difuso (Hamaguchi, 2010).

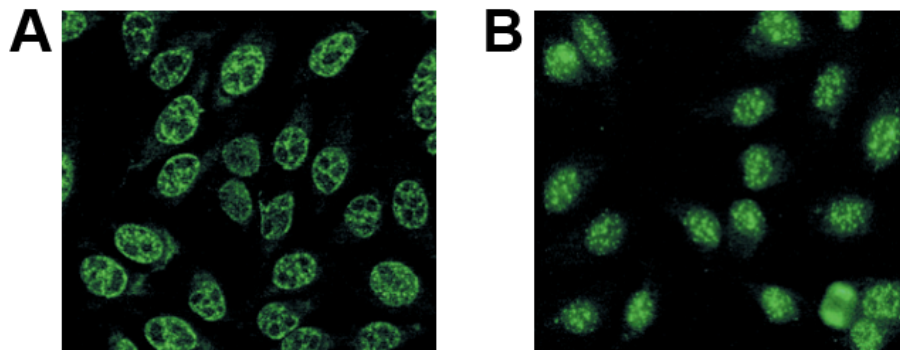


Fig. 6 Microfotografías representativas de patrones de tinción nuclear de autoanticuerpos en células HEp-2 mediante inmunofluorescencia, mostrando un patrón moteado (A), el más frecuentemente encontrado en la SSc difusa, y un patrón anti-centrómero (B), característico de la SSc limitada. Imagen modificada de Gabrielli et al., 2009.

Hay anticuerpos relacionados con otras enfermedades del tejido conectivo, que también pueden encontrarse en los pacientes de esclerodermia, como los anticuerpos anti SSA/Ro y anti SSB/La del Síndrome de Sjögren (Vij and Strek, 2013), o los anticuerpos contra la tRNA sintetasa (Jo-1), PM-Scl y Ku de las miositis (Hamaguchi, 2010; Hanke et al., 2009; Vij and Strek, 2013). Los anticuerpos anti-Sm y anti-dsDNA sólo se han detectado en pacientes con LES, del cual representan un biomarcador diagnóstico (Migliorini et al., 2005; Schroeder et al., 2013).

2.5.4 Otras moléculas

En la piel y los pulmones de pacientes con esclerosis sistémica se ha encontrado una expresión elevada de PDGF y de su receptor. Ambos se relacionan con la señalización autocrina dependiente de TGF- β e IL-1 (Grossman et al., 2011). Además, se han detectado anticuerpos estimulantes de PDGFR en el suero de los pacientes y los inhibidores selectivos de la señalización por PDGF han mostrado efectos beneficiosos en la fibrosis de la piel (Gabrielli et al., 2009), lo que indica que estas moléculas podrían estar regulando la fibrosis crónica en la esclerodermia. El PDGF estimula en los fibroblastos la síntesis de MCP-1, que posee características profibróticas (Díaz and

Guzmán, 2009). Otras moléculas también se han relacionado con la fibrosis, por un lado la trombina, que se encuentra incrementada en pacientes con EIP y en ratones con fibrosis pulmonar inducida con bleomicina; y por otro lado el ácido lisofosfatídico, también incrementado en la SSc (Bhattacharyya et al., 2011) y que actúa en la fibrosis a través de su receptor de tipo 1, ya que los ratones que carecen de él son resistentes a la fibrosis inducida por bleomicina (Castelino et al., 2011).

Las endotelinas son potentes péptidos vasoconstrictores producidos por células endoteliales, macrófagos, fibroblastos y otros tipos celulares (Bhattacharyya et al., 2011). La endotelina-1 actúa juntamente con el TGF- β para convertir los fibroblastos en miofibroblastos. La endotelina se encuentra elevada en el suero de pacientes con SSc, especialmente en aquellos con úlceras digitales y afectación de órganos internos, y se considera un biomarcador de gravedad en la enfermedad vascular (Kuryliszyn-Moskal et al., 2005; Steen et al., 2009). La angiotensina II también se encuentra sobreexpresada en pacientes con SSc y determina gran vasoconstricción y depósito de proteínas en la matriz extracelular, a través de la inducción del TGF- β (Díaz and Guzmán, 2009). Por otro lado, la organización molecular del colágeno en la esclerodermia está alterada por enlaces cruzados que normalmente se ven en el hueso pero no en la piel. Estos enlaces están formados por la lisil hidroxilasa 2, cuya expresión está aumentada en la esclerodermia. Los componentes de la matriz extracelular modulan las respuestas celulares regulando la actividad de citoquinas y factores de crecimiento, como es el caso de la interacción TGF- β -fibrilina, necesaria para la activación de los fibroblastos en la esclerodermia. También se ha detectado una expresión elevada de los receptores toll-like TLR3 y TLR4 en la piel con lesión y en las biopsias pulmonares de pacientes con SSc, sugiriendo que la exposición de fibroblastos activados a ligandos endógenos de los TLR podría exacerbar la fibrosis (Wei et al., 2011). Por último, cabe mencionar que altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y estrés oxidativo se han implicado directa o indirectamente en la esclerodermia (Gabrielli et al., 2009), ya que las ROS activan a los fibroblastos via PDGFR (Bhattacharyya et al., 2011) y se ha visto que los fibroblastos de la piel de pacientes de SSc producen espontáneamente más ROS que los de controles sanos (Bussone and Mouthon, 2011).

3. PSGL-1 y sus ligandos en la esclerodermia

En el suero de pacientes de SSc se han encontrado cambios en los niveles de las selectinas L, E y P solubles (sL-sel, sE-sel y sP-sel) así como en PSGL-1 soluble (sPSGL-1). En cuanto a la E-sel, en el suero de los pacientes con SSc se detectó un aumento de sE-sel, sin diferencias de nivel entre dcSSc y lcSSc (Ihn et al., 1998; Iversen et al., 2013). El nivel elevado de sE-sel se asocia con mayor frecuencia de fibrosis pulmonar (Ates et al., 2004; Ihn et al., 1998) y con afectación de órganos internos (Kuryliszyn-Moskal et al., 2005). La sL-sel se encontró elevada en el 35% de pacientes con dcSSc y el 16% con lcSSc, sin diferencia en el nivel de sL-sel entre ambos subtipos. Este aumento correlaciona con mayor prevalencia de inflamación de las articulaciones, úlceras y pigmentación difusa (Shimada et al., 2001). Los datos sobre el incremento de sL-sel no son concluyentes, pues se contradicen con los aportados por otros estudios en los que la concentración de sL-sel no cambia respecto a los controles sanos (Ates et al., 2004; Sfrikakis et al., 1999), o disminuye en la SSc en general (Blann et al., 1996), o disminuye solo en la dcSSc correlacionando inversamente con la magnitud de la enfermedad (Dunne et al., 2012). También hay controversia respecto a la sP-sel, ya que se ha descrito que puede incrementarse por igual tanto en la dcSSc como en la lcSSc (Blann et al., 2003a; Iversen et al., 2013), que puede aumentar más en el subtipo difuso (Sfrikakis et al., 1999) o bien no cambiar (Ates et al., 2004). En otro estudio, tanto la sE-sel como la sP-sel se encontraban elevadas en la fase temprana de la SSc (Gruschwitz et al., 1995). Por tanto, los datos sobre la concentración de las selectinas solubles en la SSc aún no están claramente definidos.

Al contrario que con las selectinas, el aumento de sPSGL-1 no se asocia con mayor gravedad de la enfermedad. En un estudio se observó el aumento de sPSGL-1 en suero en el 42% de los pacientes de SSc, sin diferencias entre lcSSc y dcSSc. Los pacientes sin fibrosis pulmonar tendían a tener mayores niveles de sPSGL-1 en la fase temprana de la enfermedad. En contraste, aquellos con afectación pulmonar tenían niveles más bajos (Yanaba et al., 2004). Por otro lado, se ha descrito en pacientes de colitis ulcerosa, el incremento de sPSGL-1 respecto a los controles (Ajdukovic et al., 2015) y la presencia de sPSGL-1 en el lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos alérgicos tras suministrarles un alérgeno diluido (Davenpeck et al., 2000). Estos datos sugieren que la expresión de PSGL-1 y sus niveles en el suero sanguíneo están implicados de alguna manera en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias.

4. Modelos animales de esclerodermia

Se han desarrollado varios modelos animales para tratar de dilucidar los genes implicados en el desarrollo de la esclerodermia e identificar moléculas diana para su tratamiento. En algunos de ellos la enfermedad se ha inducido con moléculas exógenas, como en el modelo de la bleomicina, en el cual ésta se inyecta en el lomo de los ratones. En este caso se produce esclerosis dérmica en las áreas que rodean al sitio de inyección, en las que se produce depósito de colágeno e infiltrados celulares, además en el suero pueden detectarse autoanticuerpos. Sin embargo, la fibrosis no ocurre a nivel sistémico y no se producen los cambios vasculares típicos de la SSc, por el contrario, sí aumenta la densidad capilar (Beyer et al., 2010; Yamamoto, 2010). En la enfermedad injerto contra huésped esclerodermatosa, se transplantan células de médula ósea y del bazo de ratones B10.D2 a ratones BALB/c irradiados. Este modelo reproduce algunas características de la esclerodermia, como fibrosis de piel y pulmón e infiltración cutánea de células mononucleares, pero no presenta vasculopatía (McCormick et al., 1999).

Otro tipo de modelos son los genéticos, en los cuales la presencia de mutaciones en distintos genes o su sobreexpresión desencadenan la enfermedad. En la línea de pollos UCD-200 se desarrolla espontáneamente una enfermedad que comprende las principales características de la SSc, como fibrosis de la piel y el esófago, lesiones vasculares e infiltración mononuclear en piel, corazón y riñón, y autoanticuerpos. También presentan poliartritis, necrosis digital y de la cresta, y aumento de la mortalidad. Pero a diferencia de la esclerodermia humana, se produce una proliferación de los vasos pequeños de la piel y el espectro de autoanticuerpos no incluye anti-Scl-70. Además, los pulmones son normales y solo 1 animal presentaba engrosamiento de las paredes de los vasos e infiltración en el pulmón. Por otro lado, la afectación de las gónadas dificulta la cría de estos animales (Beyer et al., 2010; Gershwin et al., 1981; Gruschwitz et al., 1993), lo que dificulta la perpetuación de este modelo.

En cuanto a los modelos genéticos en ratones, se ha visto que el aumento de la señalización de TGF- β en fibroblastos causa fibrosis de la piel en un modelo de ratón que expresa constitutivamente el receptor I de TGF- β . Además, estos ratones presentan vasculopatía en pulmón y riñón. Sin embargo, no muestran fibrosis pulmonar ni insuficiencia renal, y carecen de autoinmunidad e inflamación (Sonnylal et al., 2007). Se ha descrito que la expresión en ratones de un receptor de TGF- β tipo II deficiente en

la quinasa, sorprendentemente causaba fibrosis dérmica y pulmonar, además de remodelado vascular, pero no fenómenos de autoinmunidad (Beyer et al., 2010; Denton et al., 2003).

En el modelo Fra-2 (Fos-related antigen-2) se dan tanto la fibrosis cutánea acompañada de infiltrados y densidad capilar disminuida, como la hipertensión pulmonar y la NINE. Sin embargo no hay autoinmunidad ni se encuentra patología renal (Maurer et al., 2013; Maurer et al., 2012). Los ratones Tsk-1 (tight skin, piel tensa) son heterocigotos para una duplicación en el gen de la fibrilina 1, una proteína de la matriz extracelular. Estos ratones desarrollan autoanticuerpos incluido el anti-Scl-70 pero en contraste con la SSc humana presentan hiperplasia hipodérmica en vez de fibrosis dérmica y la alteración pulmonar es parecida al enfisema; tampoco aparecen cambios vasculares. Los ratones Tsk-2 presentan un fenotipo parecido a los Tsk-1 pero incluye infiltración mononuclear en la dermis e hipodermis y sus pulmones son normales. El modelo de ratón deficiente en caveolina-1 desarrolla fibrosis en la piel y pulmón, ya que la internalización del receptor de TGF β depende de la caveolina y su ausencia aumenta la señalización. Estos ratones también resultan afectados por hipertensión pulmonar y alteraciones metabólicas y del sistema urogenital (Beyer et al., 2010).

Hasta ahora, ninguno de los modelos animales descritos para la esclerodermia imita completamente a la enfermedad humana (Galdo and Matucci-Cerinic, 2014). Recientemente, en un trabajo publicado posteriormente al nuestro, se ha descrito que la baja expresión de los factores de transcripción Fli1 y KLF5 (represores de CTGF) en ratones causa alteraciones compatibles con la SSc, como fibrosis dérmica, NINE, alteraciones vasculares en piel y pulmón, autoanticuerpos y activación de linfocitos B. Sin embargo, en este trabajo no describen cómo se desarrolla la enfermedad, ni si se origina daño renal o se producen alteraciones vasculares en el riñón (Noda et al., 2014). Puesto que el ratón es la especie más utilizada en investigación, resultaría conveniente disponer de un modelo de esclerodermia en ratón. A este respecto, hemos estudiado las características del ratón deficiente en PSGL-1 con el fin de establecer si cumple con los criterios para ser un buen modelo de SSc.

OBJETIVOS

El trabajo presentado en esta tesis doctoral tiene dos objetivos principales:

1. La caracterización del ratón deficiente para el receptor leucocitario PSGL-1 como modelo de una enfermedad autoinmune similar a la esclerosis sistémica humana. Descripción de la enfermedad y su evolución con el envejecimiento. Para ello, hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

- Estudio histológico de la estructura de la piel, riñón y pulmón antes de la aparición de síntomas (1'5-3 meses de edad) y a edades avanzadas (1-2 años de edad).
- Estudio de autoinmunidad: Caracterización de los autoanticuerpos circulantes que aparecen relacionados con las enfermedades autoinmunes.
- Estudio del sistema vascular de la piel, el riñón y el pulmón.
- Valoración de la afectación muscular y del estado metabólico.
- Análisis de la supervivencia del animal a lo largo del tiempo.
- Estudio inmunofenotípico de la piel, para caracterizar las poblaciones leucocitarias presentes y su estado de activación.
- Análisis del nivel de activación basal de macrófagos derivados de progenitores de médula ósea.

2. Estudio de la posible implicación de PSGL-1 y sus ligandos en el desarrollo de los distintos subtipos de esclerosis sistémica (SSc) en humanos. Para ello, se analizará la concentración de PSGL-1 y las selectinas P, E y L en el suero de pacientes con SSc difusa, pacientes con SSc limitada y donantes sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo experimental

Para la realización de esta tesis hemos utilizado ratones C57BL/6 PSGL-1^{-/-}, que fueron donados por los doctores M. K. Wild y D. Vestweber (Instituto Max Planck de Biomedicina Molecular, Münster, Alemania). Los animales control C57BL/6 se obtuvieron del Jackson Laboratory. Los ratones empleados se mantuvieron en el Animalario Convencional de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y en el Animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) (Madrid). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a las siguientes edades: 1.5, 3, 9, 12, 15, 18 meses. A partir de los 21 meses de edad, los ratones se sacrificaron cuando alcanzaban alguno de los criterios de punto final establecidos. Se extrajeron la piel, la sangre y los órganos internos para su posterior análisis. Todos los experimentos y la cría de los ratones se llevaron a cabo de acuerdo con las normas institucionales de cuidado animal y bioética de los dos centros correspondientes.

2. Ensayos para detectar, identificar y cuantificar autoanticuerpos en el suero de ratón

Para detectar la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA) en el suero de los ratones, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células HEp-2. El suero de los ratones control y PSGL-1 KO se incubó 30 minutos con células HEp-2 (dilución 1:20), para analizar la presencia de ANA y la identificación del patrón anti-centrómero, y con *Crithidia luciliae* (dilución 1:10) para estudiar la presencia de anticuerpos anti-dsDNA, en portaobjetos de Inova Diagnostics. Posteriormente, se incubaron 30 minutos con anticuerpo de cabra anti-ratón (dilución 1:100) marcado con AlexaFluor 488 (Invitrogen). Los autoanticuerpos para los autoantígenos SSA, U1-RNP, Sm, Jo-1 y Scl-70 se cuantificaron mediante ELISA con el kit QuantaLite de Inova Diagnostics. Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo IgG (H+L) de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (dilución 1:2500) de Pierce Antibodies (Thermo Scientific). El límite de positividad en el ELISA para cada autoanticuerpo se determinó como la media más 2 desviaciones estándar (DE), obtenida del suero de al menos 100 ratones control de edades comprendidas entre 1.5 y 24 meses,

con al menos 25 ratones para cada grupo de edad. El estudio se realizó con los siguientes grupos de edad: 1.5, 3, 9 y mayores de 12 meses de edad.

3. Cuantificación de moléculas solubles en el suero de pacientes

Para medir la concentración de PSGL-1 soluble se ha utilizado el CD162 ELISA kit NBP1-91256 de Novus Biologicals. Las selectinas solubles se han cuantificado con los siguientes kits de ELISA de bioNova: CD62E/ELAM-1/E-Selectin, CD62L/LAM-1/L-Selectin y CD62P/ P-Selectin. En todos los casos se han seguido las indicaciones del fabricante. En este estudio sólo hemos incluido a mujeres por ser las principales afectadas por esta enfermedad. Como controles se han utilizado los sueros de 32 voluntarias sanas en un amplio rango de edad que va desde los 19 hasta los 80 años, que corresponde al rango de edad de las enfermas, para que los posibles cambios de expresión debidos a diferencias de edad no influyeran en el resultado final. Las muestras de suero de pacientes abarcaban 22 mujeres con edades comprendidas entre los 26 y los 82 años, y se clasificaron en 2 grupos: pacientes con esclerosis sistémica limitada (lcSSc), cuyo grupo comprendía 13 mujeres; y pacientes con esclerosis sistémica difusa (dcSSc), que incluía a 9 mujeres.

4. Análisis bioquímicos

La cuantificación de proteínas y de hemoglobina en orina se determinó con las tiras reactivas Combur Test M dipsticks de Roche. El punto de corte para la proteinuria y hematuria fue el valor más bajo obtenido en los ratones PSGL-1 KO y no alcanzado por ninguno de los controles (a partir de 2 en una escala cualitativa de color de 0 a 4). El análisis se realizó con ratones de 18-24 meses de edad (18 controles, 27 KO) ya que el test no dio positivo en ningún animal de edad inferior, tanto controles como PSGL-1 KO.

Los niveles séricos de glucosa, colesterol, urea, creatinina, albúmina, creatina quinasa (CK) y aspartato aminotransferasa (AST) de ratones control y PSGL-1^{-/-} fueron medidos en un auto-analizador Dimension RxL Max (Siemens) en el CNIC. Para

cuantificar la creatinina, albúmina y urea se utilizó el suero sanguíneo de ratones de 3 meses y de 18-24 meses de edad, entre 8 y 12 ratones por grupo. Para analizar la concentración en suero de las enzimas CK y AST se seleccionaron dos grupos de ratones, uno de 3 meses de edad y otro de mayores de 18 meses, con un mínimo de 10 ratones por cada grupo. En cuanto a la glucosa y el colesterol, las medidas se tomaron en el suero de ratones de entre 4 y 8 meses de edad, en al menos 6 ratones por grupo.

5. Valoración del metabolismo

Para estudiar diferencias en la actividad metabólica de los ratones deficientes en PSGL-1 respecto a los ratones control se hizo una monitorización del peso corporal, la ingesta de comida y el peso de las deposiciones durante cinco días consecutivos. Para ello, el día cero se pesaron los ratones y la comida de partida de cada jaula. Cada día se volvieron a pesar los ratones y la comida sobrante, y se recogieron y pesaron las deposiciones de cada jaula. Con los datos recogidos se calculó la ingesta de comida diaria, el peso medio de los ratones y la media de deposiciones por ratón. Se utilizaron grupos de 5-7 ratones, machos y hembras, de 3 y 23 meses de edad.

6. Análisis histológico

Las muestras de tejido se fijaron con formalina al 4% y se incluyeron en parafina. Posteriormente se hicieron cortes de 4 μ m de espesor y se realizaron diversas tinciones. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Leica DM2500 y una cámara Leica DFC450. Para estudiar la estructura de los tejidos se tiñeron con hematoxilina de Harris (Merck) y Eosina Y en solución alcohólica (Leica Biosystems, Germany). La valoración del colágeno se realizó mediante tinción con tricrómicro de Masson (TM) utilizando el kit Artisan Gomori's Green Trichrome Stain kit (Dako, USA).

6.1. Clasificación de los tipos de colágeno

Para comprobar si el proceso de fibrosis afectaba a la composición del colágeno de la piel, se realizó la tinción rojo picosirius en muestras de piel de ratones control y PSGL-1^{-/-} de 1.5 y 24 meses de edad para poder comparar los tipos de fibras de colágeno en ambos grupos. El colágeno posee una birrefringencia natural debida a la disposición de sus fibras y esta propiedad es realzada por la tinción rojo picosirius, lo que provoca que las fibras desvíen la luz polarizada de forma diferente según su grosor y disposición. El colágeno de tipo I, que forma fibras gruesas compuestas por fibrillas densamente empaquetadas, birrefringe con un color de naranja a rojo. El colágeno de tipo III forma fibras finas, compuestas por fibrillas finas poco compactadas, y presenta una birrefringencia verde. Las fibras de colágeno I de nueva formación son finas, por lo que mostrarán también birrefringencia verde y no se pueden distinguir de las de colágeno III. Esta tinción se llevó a cabo en la Unidad de Patología del CNIC y las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (National Institutes of Health [NIH]).

6.2. Valoración de la fibrosis en la dermis

Todas las secciones de piel se obtuvieron de la región paramedial escapular (la parte superior de la espalda) con el fin de minimizar las variaciones regionales en el grosor de la misma. El grosor de la dermis se definió como la anchura de piel desde la membrana basal de la epidermis hasta la unión de la dermis con la grasa subcutánea (hipodermis). El grosor de la hipodermis se definió como la anchura desde la unión dermis-hipodermis hasta la unión de la hipodermis con la capa continua de músculo. En cada ratón se midieron las secciones más gruesa y más delgada en al menos 3 áreas diferentes, tanto de la dermis como de la hipodermis. Se analizaron al menos 9 ratones por cada genotipo y sexo en animales de 1.5-3 meses de edad en un grupo y de 12 a 24 meses en el otro, mediante el programa ImageJ (NIH).

6.3. Valoración de las alteraciones histológicas renales

Para valorar el grado de afectación renal se cuantificó la presencia de infiltrados intersticiales tubulares en secciones de riñón teñidas con H/E de ratones de 1.5-3 meses de edad y de 12-24 meses de edad, entre 7 y 17 animales por grupo. Asimismo, se cuantificó la presencia de áreas infartadas, caracterizadas por fibrosis y pérdida de la estructura tisular, en secciones de riñón teñidas con TM en ratones de 18-24 meses de edad, en al menos 11 ratones por cada grupo.

6.4. Valoración de las alteraciones histológicas pulmonares

Para establecer si los pulmones de los ratones deficientes para PSGL-1 presentaban neumonía intersticial no específica (NINE), examinamos los pulmones de ratones control y PSGL-1 KO de 1.5-3 meses de edad y de 12-24 meses de edad, machos y hembras (n = 9-23 ratones por grupo). Se consideraron características de la NINE el aumento de celularidad intersticial, el engrosamiento de los septos alveolares y la alteración de la estructura del parénquima pulmonar. En nuestro estudio, observamos la presencia de estas características en preparaciones teñidas con H/E y TM.

Asimismo, se detectaron infiltrados celulares mediante inmunohistoquímica (IHQ) del antígeno panleucocitario CD45. Para la exposición de antígenos, las muestras se desenmascararon en citrato 10 mM pH6 con 0.05 % Tween 20, durante 15 minutos de ebullición en microondas a una potencia media de 240 W. Tras su enfriamiento se lavaron con PBS/0.05% Tween 20, 3 veces de 5 minutos cada una, se bloqueó la peroxidasa endógena con 0.09 % de agua oxigenada en metanol durante 20 minutos y se volvieron a lavar. Se realizó una incubación de 45 minutos con PBS/2% BSA/0.05% Tween 20 para bloquear uniones inespecíficas. Seguidamente se incubó 1 hora con el anticuerpo de rata anti-ratón anti-CD45 (1:300) (Becton Dickinson, USA). Posteriormente, las muestras se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario de conejo anti-rata conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (1:300) de Dako. Posteriormente se lavaron y revelaron con el DAB peroxidase substrate kit de Vector (DAB es la 3,3'-diaminobencidina), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para finalizar, la reacción se detuvo con agua, las muestras se tiñeron con hematoxilina para

visualizar la estructura del tejido, se deshidrataron y montaron con Eukitt (Sigma-Aldrich, USA).

6.5. Evaluación de la alteración vascular

El daño vascular en la piel se valoró mediante IHQ, para visualizar el endotelio vascular, con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CD31 de ratón (Abcam), realizada en la Unidad de Patología del CNIC con un Autostainer Plus Staining System de Dako. Se analizaron secciones de piel de ratones control y PSGL-1^{-/-} de 23 meses de edad, 4 machos y 4 hembras por cada genotipo. Se consideraron vasos sanguíneos las estructuras teñidas con CD31 que tenían lumen interno. Para cada ratón se contabilizó el número total de vasos en la dermis en 10 campos consecutivos visualizados con el objetivo 40x, que dan una longitud total de 1727 μm .

En cuanto a la alteración de los vasos pulmonares y renales, se midió el grosor de la pared muscular de los vasos de diámetro menor de 50 μm en el pulmón y menor de 20 μm en el riñón. Para ello se realizó un estudio IHQ con anticuerpo monoclonal de ratón anti-SMA de humano (Dako), que reconoce la actina de músculo liso de ratón por reacción cruzada, al ser la actina una proteína bastante conservada. El procedimiento a seguir fue el mismo que en el de la IHQ anteriormente descrita, pero utilizando una concentración de anticuerpo primario anti-SMA de 1:250. En lugar de un paso de anticuerpo secundario, se utilizó el LSAB kit universal HRP Rabbit/Mouse/Goat DAB+ de Dako, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para estimar el área de la pared muscular de los vasos teñidos con SMA se utilizó el diámetro corto como diámetro del vaso, y al área total se le restó el área del lumen para obtener el área de la pared. Se calculó la media del grosor de pared en ratones control y PSGL-1^{-/-}, machos y hembras, de 3 meses de edad en el caso de los vasos pulmonares, y de 3 meses y 18-24 meses de edad para los renales, con al menos 4 ratones por grupo. El número mínimo de vasos analizados fue de 25 vasos por ratón en el caso del riñón y de 140 vasos por grupo para el pulmón. Las mediciones se realizaron mediante el programa ImageJ (NIH).

6.6. Evaluación de la alteración histológica muscular

El estudio de la posible miopatía a nivel histológico se llevó a cabo mediante tinción con H/E de muestras obtenidas del músculo bíceps femoral de la pata izquierda del animal, con el fin de detectar alteraciones en la estructura del tejido y presencia de infiltrados inmunes. Para ello se analizaron ratones control y PSGL-1 KO de 3 meses de edad, 5 machos y 5 hembras por cada genotipo.

7. Cuantificación del colágeno

Para medir la concentración del colágeno soluble en piel, riñón y pulmón de ratones control y PSGL-1 KO utilizamos el Sircol kit de Biocolor (UK). Las muestras analizadas consistían en el pulmón derecho de ratones de 8 meses de edad, un riñón de ratones de 23 meses de edad y una muestra de piel de 28 ± 6 mg de media de ratones de 3 y 24 meses de edad. Las muestras de pulmón, riñón y piel de 3 meses de edad se sometieron a un proceso de extracción del colágeno en ácido acético 0.5M / pepsina 0.1 mg/ml durante 15 horas a 4°C. En el caso de las pieles de animales de 24 meses se realizó una extracción de 15h a 4°C y posteriormente dos consecutivas de 90 minutos a temperatura ambiente.

8. Análisis del sistema inmune residente en la piel

Para analizar las poblaciones celulares de la piel, se incubaron secciones de tejido de 1 mm² en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 4% de FCS (suero de ternera fetal) (HyClone), Colagenasa IA 1 mg/ml, Dispasa 50 µg/ml, DNAasa 40 µg/ml (enzimas de Sigma-Aldrich), en agitación de 100 rpm y a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se filtraron y lavaron con PBS/BSA 0.1% / EDTA 5 mM. A continuación, las células se marcaron con el anticuerpo biotinilado durante 30 minutos en hielo y se lavaron. Después, fueron fijadas y permeabilizadas durante 1 hora con Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization Solution (Becton Dickinson) y se volvieron a lavar. Posteriormente se tiñeron durante 30 minutos en hielo con anticuerpos conjugados a PE (Ficoeritrina), FITC (Isotiocianato de fluoresceína), APC

(Aloficocianina), PE-Cy7 (Tándem de ficoeritrina con cianina) y estreptavidina conjugada con PerCP (Complejo Proteína Peridina-Clorofila) (todos de Becton Dickinson). Los anticuerpos monoclonales de rata reconocían las siguientes moléculas murinas: CD3, CD4, CD8, CD25, Foxp3, CD11c, F4/80, B220, LFA-1, interleuquina-12 (IL-12), IL-10, IL-4, IL-17, interferon- γ (IFN γ), Gr1, CD62L, CD69, CD86, CD40 y el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). Finalmente, las células se lavaron y analizaron con un citómetro FACSCanto II y el programa FACSDiva (Becton Dickinson).

Las proteínas de la piel se extrajeron con el T-PER tissue protein extraction buffer de Thermo Scientific y se cuantificaron con el BCA Protein Assay Kit (Pierce). En la detección de citoquinas se empleó el Th1/Th2 10-plex FlowCytomix kit para ratón de Bender MedSystems.

9. Generación de macrófagos a partir de precursores de médula ósea

Obtuvimos células de la médula ósea de la tibia de ratones de 3 meses (6 control y 6 PSGL-1 KO) y las cultivamos en placas de Petri (Becton Dickinson) con medio de diferenciación que contenía RPMI 1640 (Invitrogen, USA) suplementado con 10% de FCS (HyClone), penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 μ g/ml), L-glutamina 2 mM y 15% de medio condicionado L929 que contiene M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos). Se añadió medio de diferenciación nuevo cada 3 días y se estudió el fenotipo de los macrófagos obtenidos entre los días 8 y 10. La eficiencia de diferenciación se valoró midiendo la expresión del marcador de superficie F4/80 por citometría de flujo. La penicilina, estreptomycin y L-glutamina fueron proporcionados por el equipo de cultivo del CNIC, y las células L929 fueron donadas por el grupo de Mercedes Ricote (CNIC).

10. Análisis estadístico

Para seleccionar los tests adecuados primero se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov para analizar la normalidad de las variables y el test de Levene para comparar

la homocedasticidad de las varianzas. Las variables paramétricas se analizaron mediante el test de la t de Student de dos colas y las variables no paramétricas con el test de la U de Mann-Whitney. Para la comparación de frecuencias utilizamos el test de chi cuadrado con un grado de libertad. En el ensayo de supervivencia realizamos el test de chi cuadrado Mantel-Cox con un grado de libertad. La significancia estadística se mostró de la siguiente forma: * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.005$. Todos los análisis se hicieron con el programa SPSS versión 15.0 (IBM).

RESULTADOS

1. Estudio del síndrome autoinmune desarrollado por el ratón deficiente para PSGL-1

1.1 Desarrollo de fibrosis en la piel

La observación inicial que nos llevó a estudiar el modelo de autoinmunidad del ratón deficiente para PSGL-1 fue que, a partir de los tres meses de edad, los ratones que carecían de PSGL-1 (PSGL-1^{-/-}) presentaban una alta tasa de lesiones espontáneas en la piel de la espalda que no aparecían en los ratones control. Estas lesiones, en los animales jóvenes, consistían en zonas eritematosas limitadas, con pequeñas úlceras superficiales y estériles. Sin embargo, en los animales mayores afectaban a áreas más grandes y las lesiones eran más intensas (Fig 7).

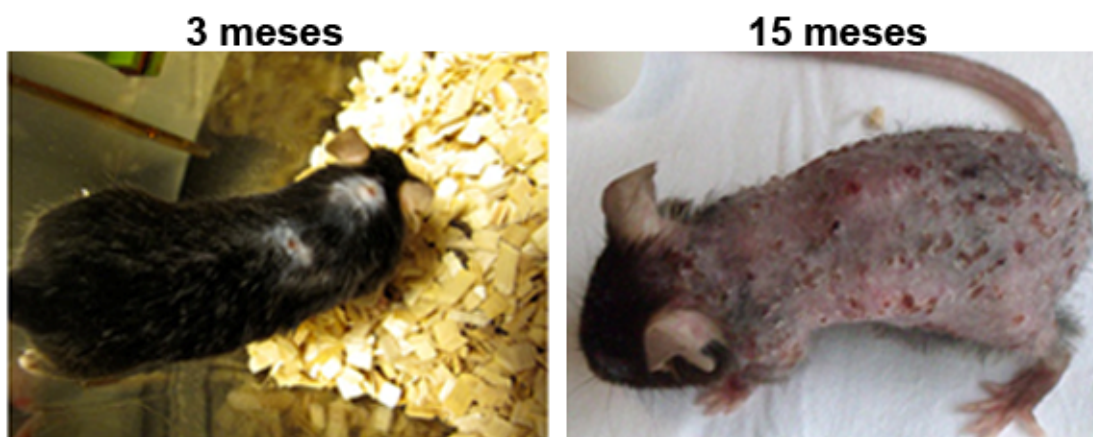


Fig. 7 Fotografías de ratones PSGL-1^{-/-} de 3 y 15 meses de edad, mostrando lesiones espontáneas en la piel.

El análisis histológico de las lesiones mostró que las úlceras eran superficiales, con necrosis epidérmica, restos celulares y un mínimo infiltrado inflamatorio en la dermis subyacente. En ratones mayores de 12 meses, las úlceras eran más grandes, también con necrosis epidérmica y restos celulares, y los fibroblastos aparecían posicionados horizontalmente en una dermis con marcada fibrosis (Fig. 8), llegando a observarse, en algunos casos, proliferación de la epidermis (acantosis) (Fig. 8 y 9).

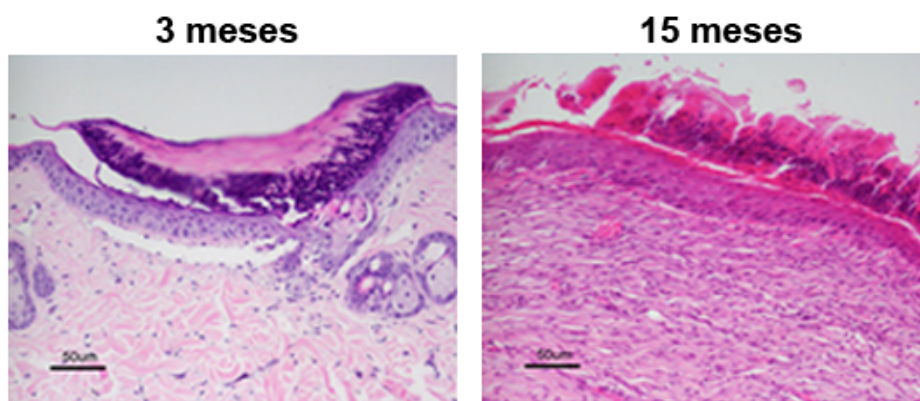


Fig. 8 Fotografías de secciones de piel teñidas con hematoxilina y eosina (H/E) de heridas de ratones PSGL-1^{-/-} de 3 y 15 meses de edad (magnificación 20x).

Previamente se había descrito que la estructura de la piel de los ratones machos era diferente a la de las hembras (Azzi et al., 2005). Como se observa en la Fig. 9, si se comparan ratones de la misma edad, las hembras tienen la hipodermis algo mayor que la de los machos y, por el contrario, la dermis de los machos es mayor que la de las hembras. Por esta razón, analizamos histológicamente la piel de la región paramedial escapular tanto de los machos como de las hembras que carecen de PSGL-1. El estudio histológico reveló que en los ratones deficientes en PSGL-1, independientemente de la presencia de úlceras, la piel mostraba un engrosamiento de la dermis con reducción de la hipodermis, que corresponde a la capa de grasa que hay debajo de la dermis (lipoatrofia). Esto ocurría tanto en los machos como en las hembras y era evidente desde las 6 semanas de edad (Fig. 9). Con la edad, la hipodermis desaparece, siendo totalmente ocupada por la dermis (Fig. 10) y además se observa que las fibras de colágeno aparecen más compactas (Fig. 9). Este es un hallazgo que coincide con la fibrosis cutánea que presentan los enfermos que padecen esclerodermia.

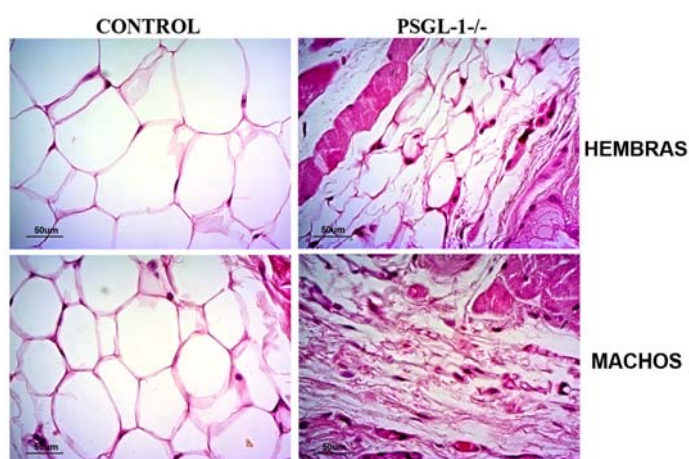


Fig. 10 Fotografías de secciones de piel de ratones hembras y machos, control y PSGL-1^{-/-}, de 24 meses de edad, teñidas con H/E (40x), mostrando lipoatrofia de la grasa en los ratones KO para PSGL-1^{-/-}.

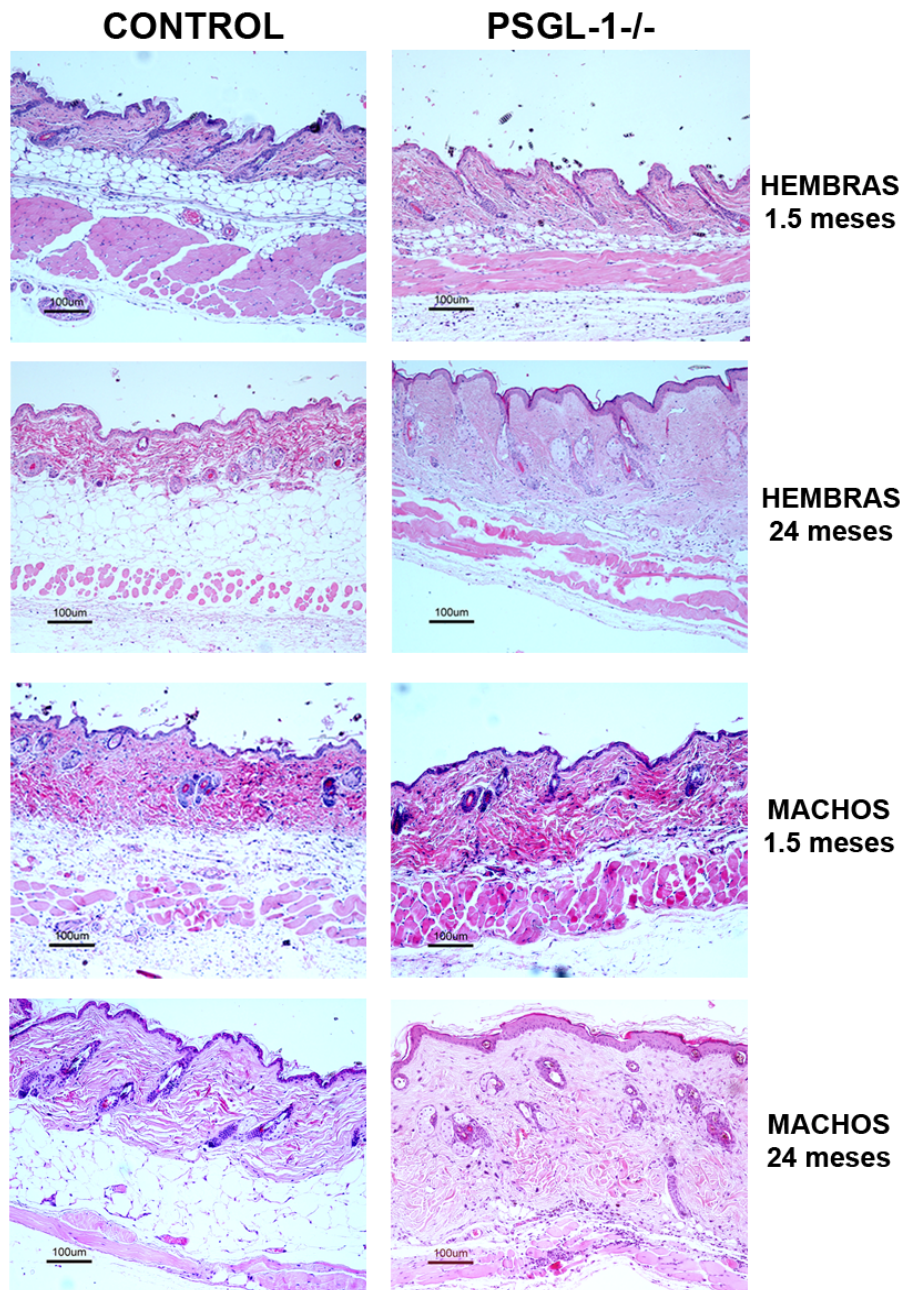


Fig. 9 Fotografías de secciones de piel representativas de ratones control y PSGL-1^{-/-}, de machos y hembras de 1.5 y 24 meses de edad, teñidas con H/E (10x).

Con el objeto de estudiar si este engrosamiento de la piel era debido a un incremento en el depósito de colágeno, lo que indicaría que está teniendo lugar un proceso de fibrosis, se realizaron tinciones con tricromico de Masson (TM) y rojo picrosirius y se calculó el contenido de colágeno en la piel de los ratones control y KO mediante ensayos de Sircol. La tinción con TM mostró una mayor extensión de la capa dérmica y reducción de la hipodermis, indicando que el colágeno se extiende

invadiendo la capa grasa de la piel, ocasionando su atrofia (Fig. 11). Además, como sugería la Fig. 9 y se observa también en la figura 11, las fibras de colágeno están más compactadas en los animales PSGL-1^{-/-}, sobre todo en los de mayor edad, sugiriendo que la acumulación de colágeno es un proceso progresivo que acaba ocasionando esclerosis en la piel.

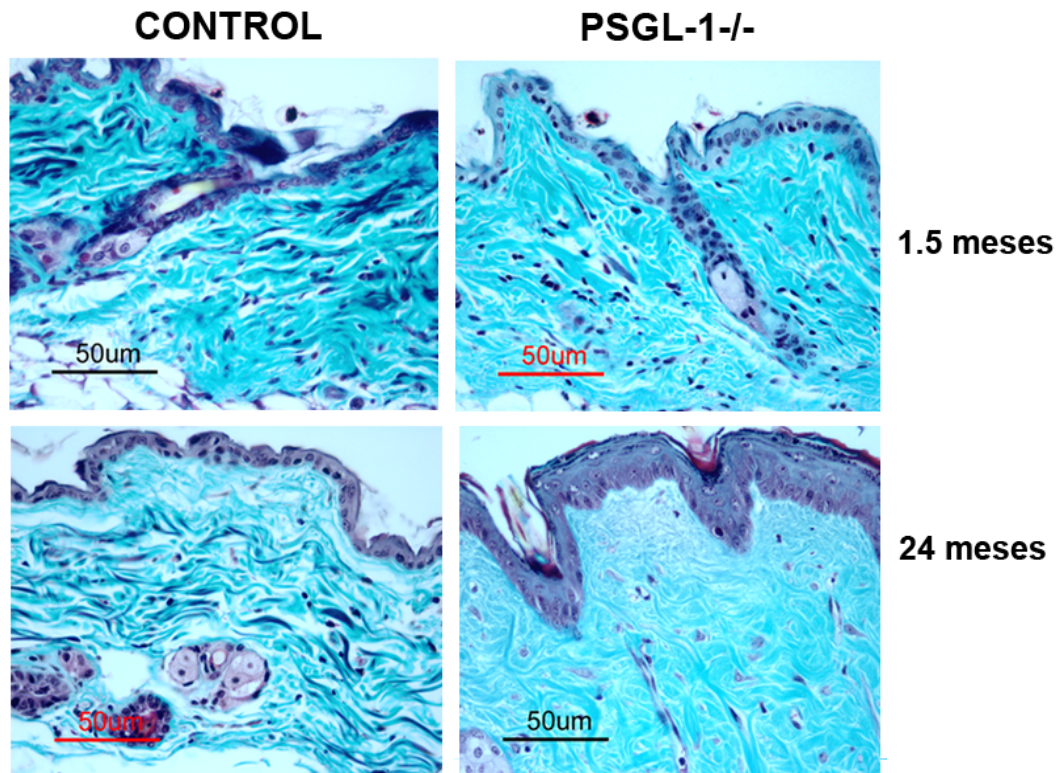


Fig. 11 Fotografías de secciones de piel representativas de ratones hembra control y PSGL-1^{-/-}, de 1.5 y 24 meses de edad, teñidas con tricrómico de Masson (TM) (40x).

Los ensayos de Sircol indicaron que, tanto en ratones jóvenes como en los viejos, la concentración de colágeno soluble en la piel de los ratones PSGL-1 KO era mayor que en la de los ratones control (Fig. 12). Esta diferencia se observa principalmente en las hembras jóvenes, llegando a ser altamente significativa. Entre los machos, la diferencia de concentración de colágeno observada es menor, probablemente debido a que la dermis en los ratones machos es mucho más gruesa que en las hembras (Fig. 9).

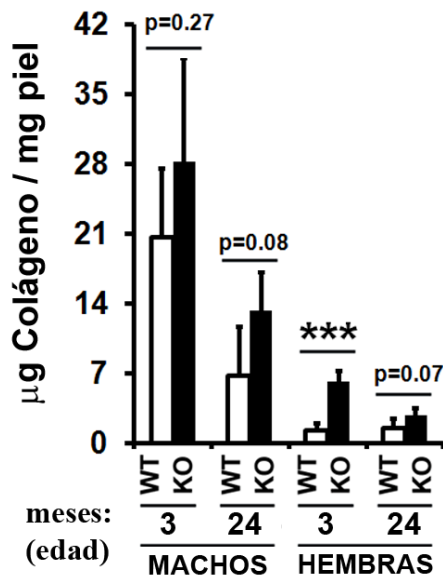


Fig. 12 Contenido de colágeno en la dermis de ratones control (WT) y PSGL-1^{-/-} (KO) de 3 y 24 meses de edad, cuantificado mediante el ensayo de Sircol (n= 4 ratones por cada grupo). Las barras representan la media \pm DE. *** = $P \leq 0.005$ en el test de la t de Student.

Para comprobar que la síntesis de colágeno es más activa en la piel de los ratones KO, lo que explicaría la acumulación progresiva de colágeno y confirmaría que está ocurriendo un proceso de fibrosis, se realizó tinción de la piel con rojo picosirius, que permite clasificar las fibras según su grosor por la forma en que desvían la luz polarizada. Las fibras que se observan de color amarillo y verde son fibras finas que incluyen tanto las fibras maduras de colágeno tipo III como las fibras de nueva formación del colágeno I, que aún no han madurado. Las fibras gruesas, que corresponden a fibras maduras de colágeno tipo I, se visualizan de color naranja y rojo (Cuttle et al., 2005; Rich and Whittaker, 2005).

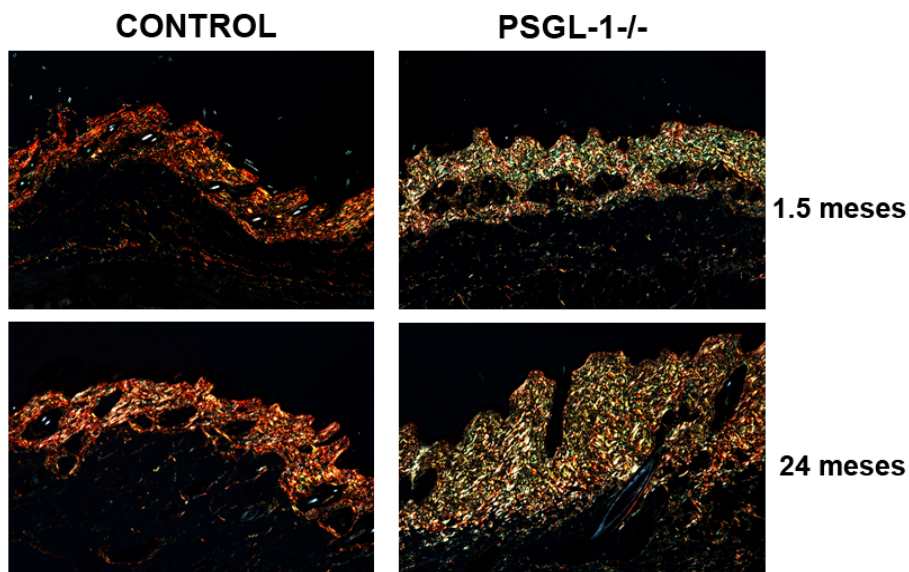


Fig. 13 Fotografías de secciones de piel representativas de ratones hembras control y PSGL-1^{-/-}, de 1.5 y 24 meses de edad, teñidas con rojo picosirius. Magnificación 5x.

Como se observa en la Fig 13, en la piel de los ratones control predominaban las fibras maduras de color naranja y rojo, mientras que en los ratones PSGL-1 KO eran mucho más abundantes las fibras delgadas de color amarillo y verde, indicando que hay mayor producción activa de colágeno en los ratones deficientes en PSGL-1.

Dado que en la piel fibrótica de los pacientes con esclerodermia la relación dermis/hipodermis es mucho mayor que en la piel de controles sanos, se midió la anchura de la hipodermis y de la dermis tanto en ratones jóvenes como en los mayores de un año. Los resultados obtenidos indicaban que desde las 6 semanas de edad, los ratones PSGL-1 KO muestran una reducción en la anchura de la hipodermis (Fig. 14A) y aumento en el grosor de la dermis (Fig. 14B), diferencia que aumenta con la edad debido al aumento de la capa de grasa en los ratones control. Consecuentemente, el cociente dermis/hipodermis se encuentra muy incrementado en los ratones PSGL-1^{-/-} comparado con los ratones control. (Fig. 14C).

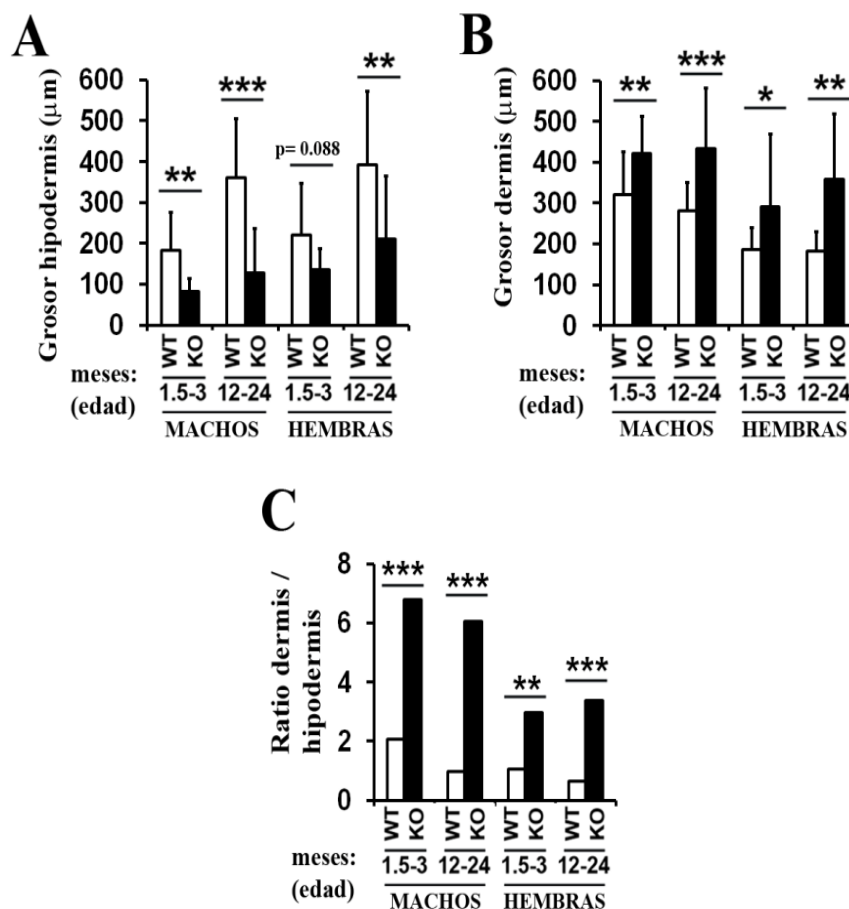


Fig. 14 Anchura de la hipodermis (A) y la dermis (B) de ratones control (WT) y deficientes para PSGL-1 (KO) jóvenes (1.5 y 3 meses de edad) y mayores (12 a 24 meses de edad), y el cociente entre ambos (C). Se han analizado al menos 9 ratones por grupo. Las barras representan la media \pm DE. * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.005$. La significación estadística se ha determinado con el test de la U de Mann-Whitney (A y C) y la t de Student (B).

Todos estos resultados demuestran que los ratones deficientes en PSGL-1 presentan fibrosis en la piel con lipoatrofia desde las 6 semanas de edad, y que la fibrosis aumenta progresivamente con la edad, llegando a producir esclerosis y a quedar totalmente atrofiada la hipodermis, hallazgos similares a los que aparecen en la esclerodermia humana.

1.2 Generación de autoanticuerpos relacionados con enfermedades autoinmunes del sistema conectivo

Dado que los ratones que carecen de PSGL-1 desarrollan un síndrome con características que recuerdan a las que se ven en la esclerodermia en humanos, procedimos a estudiar si existían también anticuerpos antinucleares, como ocurre en los pacientes con esclerosis sistémica. Ensayos de inmunofluorescencia en células HEp-2 con suero de ratones control y PSGL-1 KO, revelaron la presencia de autoanticuerpos antinucleares y anticitoplásmicos en el suero de ratones PSGL-1^{-/-} pero no en los ratones control (Fig. 15). En ningún caso se detectaron anticuerpos anti-centrómero (característicos de la esclerosis sistémica limitada) ni anticuerpos anti-dsDNA (específicos del LES).

Para analizar si estos anticuerpos reconocían autoantígenos relacionados con enfermedades autoinmunes de tejido conectivo, como la esclerodermia sistémica difusa (anti-topoisomerasa), LES (anti-Sm) o enfermedad mixta de tejido conectivo (anti-U1-RNP), se realizaron ensayos tipo ELISA. Los resultados obtenidos indicaron que el suero de los ratones PSGL-1 KO reconocía diversos autoantígenos tales como topoisomerasa I (Scl-70), U1-RNP, Sm, tRNA sintetasa (Jo-1) y SSA/Ro (Fig. 16).

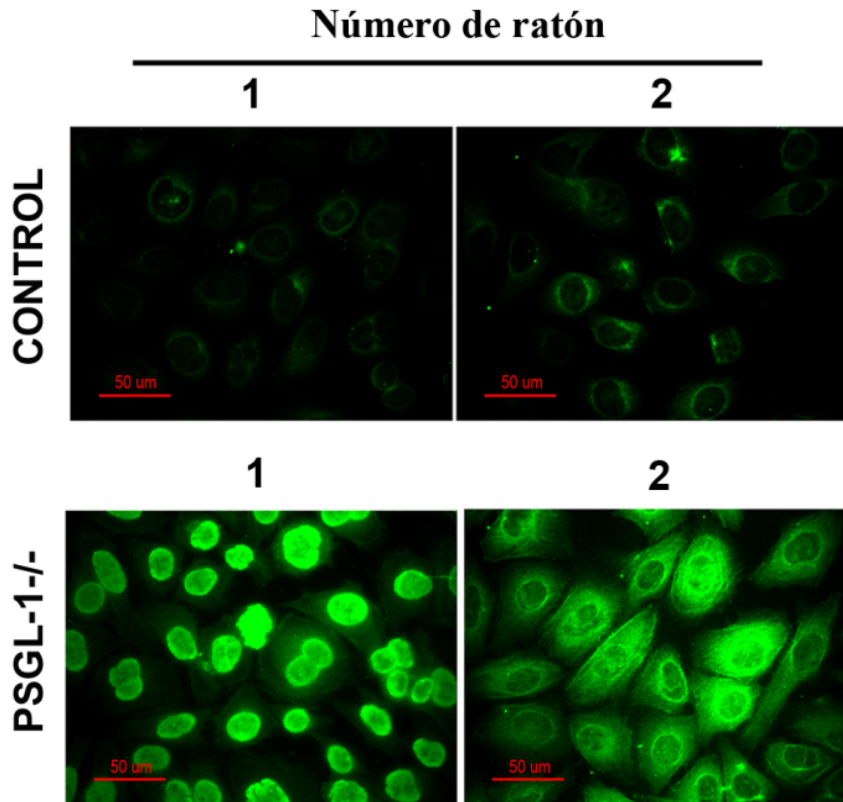


Fig. 15 Fotografías representativas de los ensayos de inmunofluorescencia realizados con el suero de 2 ratones control y 2 ratones PSGL-1^{-/-} en células Hep-2. Magnificación 40x.

El estudio de la producción de estos autoanticuerpos en ratones de diferentes edades mostró que el número de ratones que producen autoanticuerpos aumenta con el envejecimiento y que los autoanticuerpos se coexpresan en los mismos animales. Hay que destacar que los anticuerpos frente a Scl-70, U1-RNP y Sm aparecían ya en los animales más jóvenes, siendo el anti-Scl-70, específico de la esclerodermia difusa en humanos, el más prevalente en los ratones de 1.5 meses (12.5%) (Fig. 16).

En un estudio de seguimiento con 15 ratones, se analizaron los sueros a los 1.5 y 3 meses, encontrando que los ratones que dieron positivo para la topoisomerasa I a los 1.5 meses murieron antes de alcanzar los 3 meses de edad, lo que explica que el porcentaje de ratones con anticuerpo anti-Scl-70 disminuye en el grupo de 3 meses de edad, aumentando de nuevo hasta el 15% en los animales de más edad (Fig. 16).

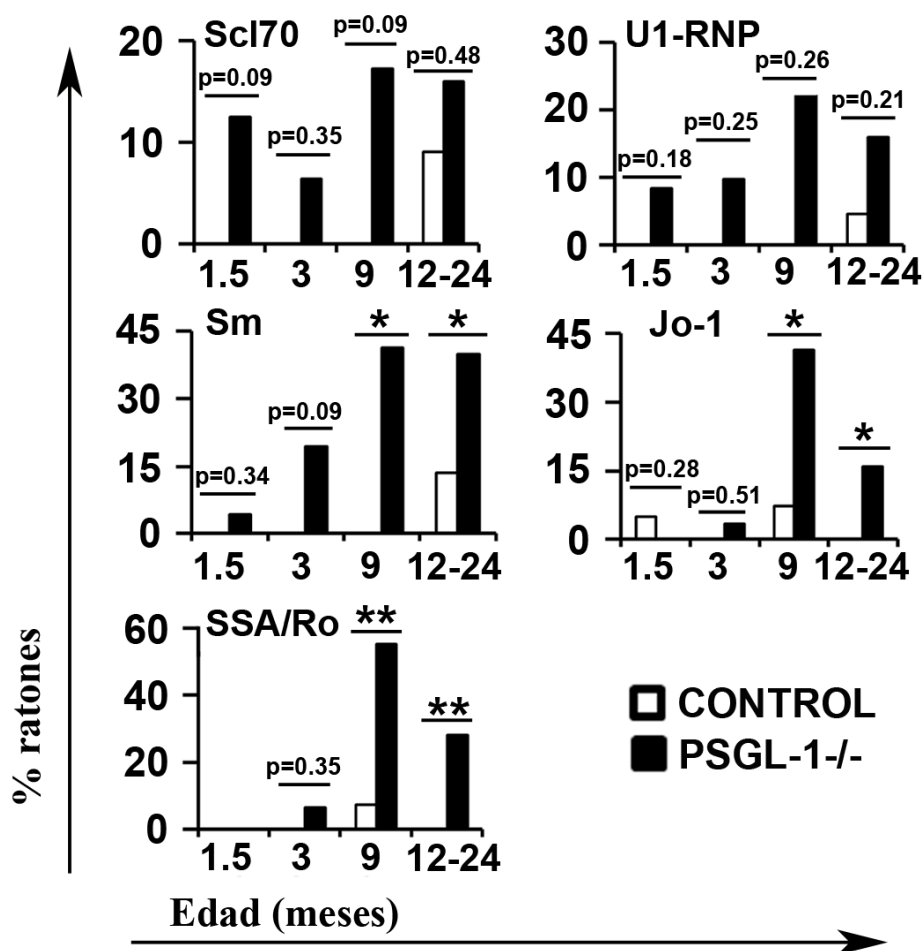


Fig. 16 Porcentaje de ratones positivos para los autoanticuerpos Scl-70, U1-RNP, Sm, Jo-1 y SSA/Ro. Las barras representan la media \pm DE (n = al menos 25 ratones por cada grupo de edad). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$. Analizado por el test de chi cuadrado.

1.3 Enfermedad renal en ratones que carecen de PSGL-1

Dado que entre los enfermos con esclerodermia sistémica es muy frecuente la afectación renal, mediante estudios histológicos y análisis bioquímicos, evaluamos la presencia de daño renal en los ratones deficientes en PSGL-1. El análisis histológico de secciones de riñón teñidas con H/E reveló la presencia de grandes infiltrados inmunes intersticiales en los ratones PSGL-1 KO de 12-24 meses de edad (Fig. 17, punta de flecha I). La cuantificación de la presencia de estos infiltrados mostró que en los animales de 1.5-3 meses de edad, estaban presentes en el 30% de las hembras, pero no en los machos. Sin embargo, a la edad de 12-24 meses, el 80% de los ratones de ambos sexos habían desarrollado infiltrados inflamatorios (Fig. 18).

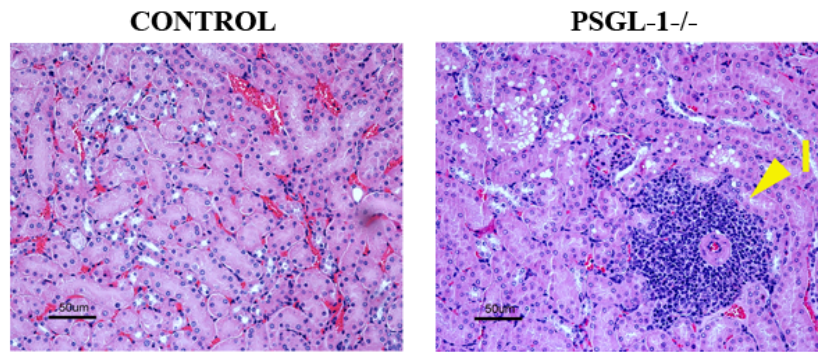


Fig. 17 Infiltración intersticial (punta de flecha I) en secciones de riñón teñidas con H/E (20x) de ratones control y PSGL-1 KO de 23 meses de edad.

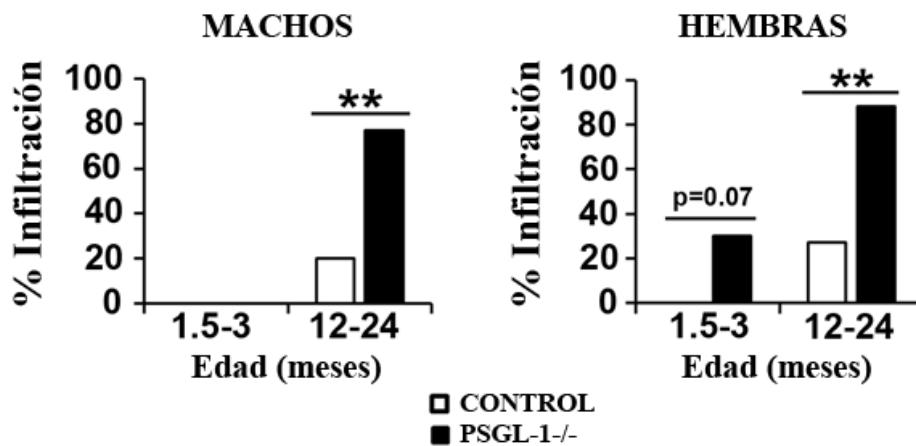


Fig. 18 Porcentaje de ratones control y PSGL-1^{-/-} con presencia de infiltrados intersticiales a nivel renal (n = 7-17 ratones por grupo). ** = $P \leq 0.01$ en el test de chi cuadrado.

Un análisis más profundo de las características histológicas de los riñones de estos ratones PSGL-1^{-/-} nos llevó a analizar el daño glomerular. Se detectó la presencia de glomérulos escleróticos, en los que se observaba acumulación de material fibroso y ruptura de la estructura glomerular (Fig. 19, punta de flecha S). También se detectó alta frecuencia de glomérulos tubularizados, los cuales estaban en parte rodeados por epitelio tubular (Fig. 19, punta de flecha T). El espacio de Bowman, que se encuentra entre las capas visceral y parietal de la cápsula de Bowman y al que entra el líquido filtrado, se encontraba en ocasiones aumentado en los ratones PSGL-1 KO (Fig. 19 y 20, punta de flecha B), lo cual podría indicar atrofia de glomérulos.

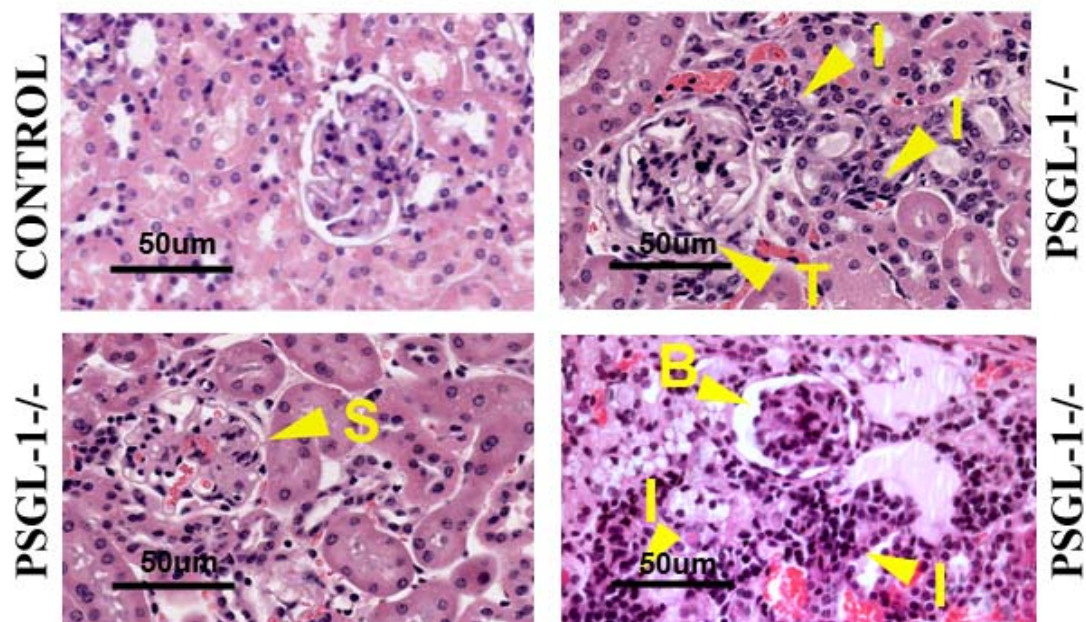


Fig. 19 Fotografías representativas de glomérulos en ratones control y PSGL-1 KO de 23 meses, teñidas con H/E (40x). Los ratones PSGL-1^{-/-} presentan glomérulos escleróticos (punta de flecha S) y tubularizados (punta de flecha T). También se encuentran glomérulos con el espacio de Bowman ampliado (punta de flecha B) e infiltrados (punta de flecha I).

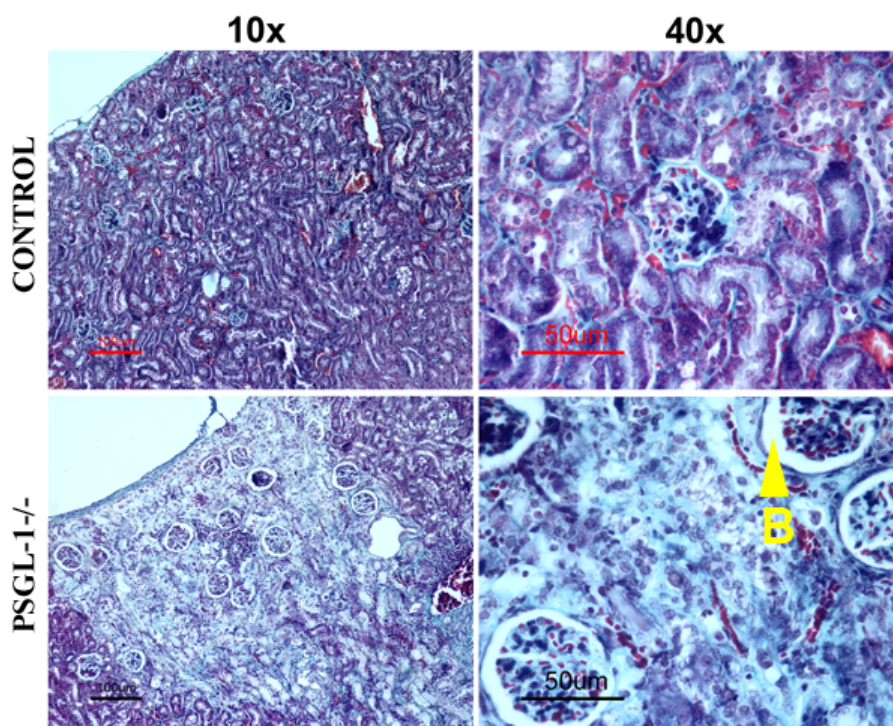


Fig. 20 Fotografías de secciones de riñón teñidas con TM de ratones control (paneles superiores) y PSGL-1^{-/-} (paneles inferiores) de 23 meses de edad, mostrando tejido sano

(control) e infartado (PSGL-1^{-/-}), en las cuales los ratones PSGL-1^{-/-} presentan glomérulos atrofiados, con ampliación del espacio de Bowman (flecha B).

El análisis del riñón mediante la tinción tricrómicro de Masson reveló la presencia de áreas infartadas en los ratones PSGL-1 KO de mayor edad, con destrucción tisular y fibrosis del área afectada (Fig. 20). La cuantificación mostró que, a partir de 18 meses de edad, casi el 50% de los machos y el 28% de las hembras deficientes para PSGL-1 tenían infartos renales, mientras que en los controles sólo se encontraban infartos en el 10% de los machos mayores de 18 meses (Fig. 21).

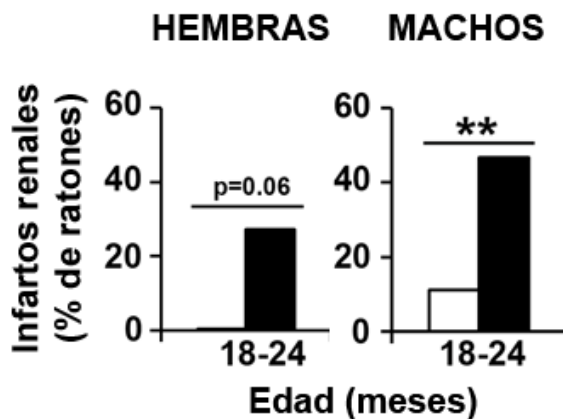
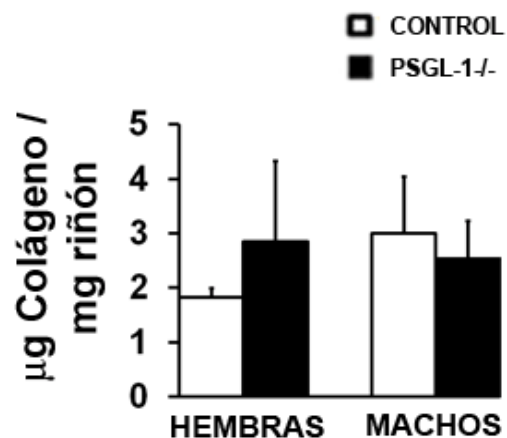


Fig. 21 Porcentaje de ratones control (barras blancas) y PSGL-1^{-/-} (barras negras) con presencia de infartos renales (n = al menos 11 ratones por grupo). ** = $P \leq 0.01$ con el test de chi cuadrado.

A pesar de la presencia de fibrosis observada en las zonas infartadas del riñón, la concentración de colágeno en riñones completos era similar en ratones controles y PSGL-1 KO, aunque con una ligera tendencia a una mayor concentración en las hembras (Fig 22).

Fig. 22 Cuantificación del colágeno en el riñón de ratones control y PSGL-1^{-/-} de 23 meses de edad, mediante el ensayo del Sircol (n = 4 ratones por grupo). Las barras representan la media \pm DE. Analizado con el test de la U de Mann-Whitney.



RESULTADOS

A los 3 meses de edad, los riñones de los animales PSGL-1^{-/-} no presentaban diferencias significativas en su peso en comparación con los controles (Fig. 23A). En cambio, a los 12 meses sí encontramos un aumento de peso en los riñones de ambos sexos de los ratones deficientes para PSGL-1, sobre todo en las hembras (Fig. 23A). Ya que el peso de los órganos suele ir en consonancia con el peso del animal, queríamos descartar la influencia de posibles diferencias en el peso de los ratones. A estas edades vimos que los pesos entre ratones control y PSGL-1 KO eran equivalentes dentro de su mismo grupo de sexo y edad (Fig. 23B). Al relativizar el peso de los riñones con el peso corporal del ratón correspondiente, pudimos comprobar que los riñones de ratones PSGL-1 KO de 1 año de edad pesaban más que los riñones control, lo que va en concordancia con el aumento de celularidad en los ratones adultos debido a la infiltración leucocitaria y con la presencia de fibrosis en las zonas infartadas (Fig. 18 y 20). La diferencia observada es mayor en el caso de las hembras, lo cual podría relacionarse con la tendencia a contener un mayor nivel de colágeno (Fig. 22).

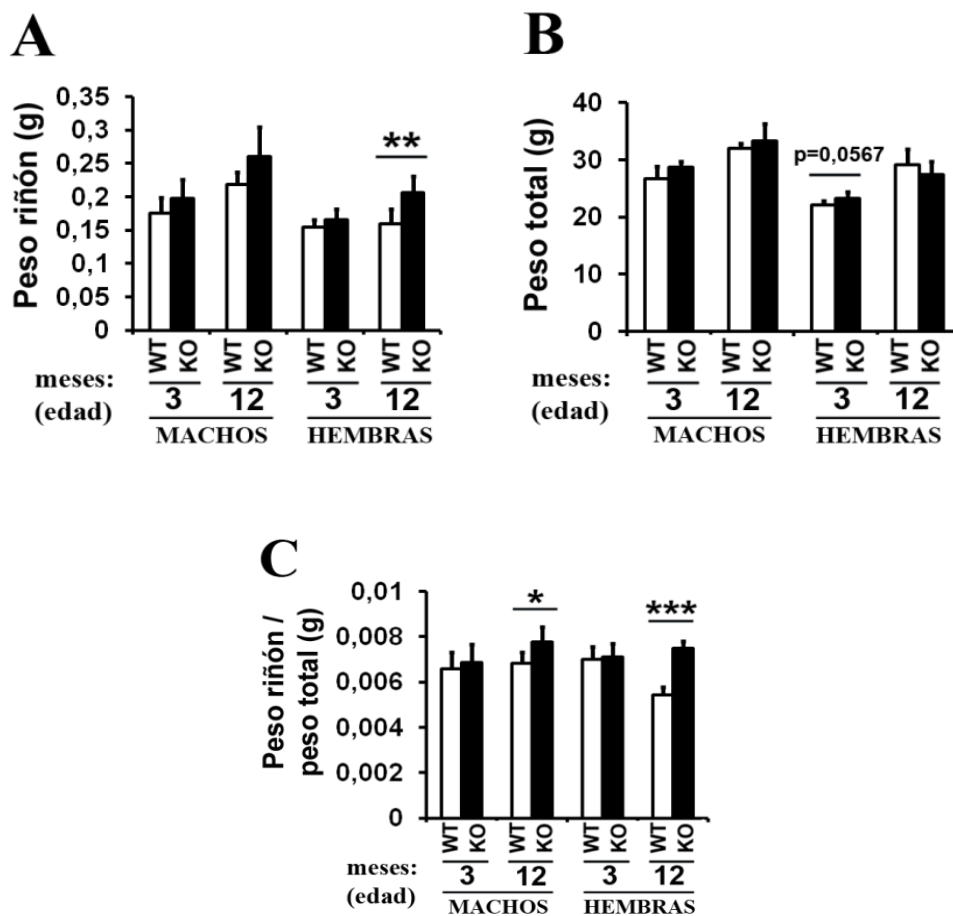


Fig. 23 Medidas del peso del riñón (A), el peso total del animal (B) y la relación entre ambos (C) en ratones control (WT) y PSGL-1 KO de 3 y 12 meses de edad (n = al menos 3 ratones por grupo). Las barras corresponden al peso medio expresado en gramos y representan la media \pm DE. * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.005$. El peso de los ratones se ha analizado con el test de la U de Mann-Whitney (machos de 3 meses) y la t de Student (los otros grupos). La significación estadística tanto del peso del riñón como del cociente entre pesos se ha determinado mediante la t de Student.

Para evaluar la función renal, se midieron diferentes parámetros en suero y orina, como la concentración de creatinina, urea y albúmina en la sangre y la presencia de proteínas y sangre en la orina. Detectamos proteinuria en el 15% de los ratones PSGL-1 KO de 18-24 meses de edad, y hematuria en el 50% del mismo grupo de ratones (Fig. 24A). En cuanto al análisis bioquímico del suero, se encontraron mayores niveles de urea y creatinina en los ratones PSGL-1^{-/-} de 3 meses, así como una tendencia a un nivel menor de albúmina (Fig. 24, B, C y D). Estos datos indican que los ratones PSGL-1 KO tienen alterada la función renal, con pérdida de proteínas por la orina, lo que coincide con una disminución de la albúmina en la sangre y del filtrado glomerular, por lo que los niveles de urea y creatinina en sangre son mayores.

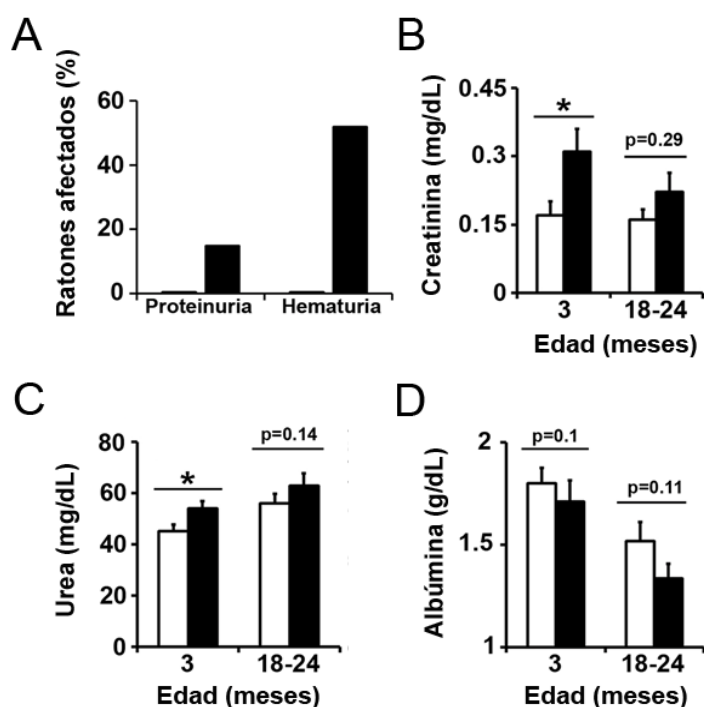


Fig. 24 (A) Porcentaje de ratones con proteinuria y hematuria, en ratones de 18-24 meses (18 controles, 27 PSGL-1^{-/-}). Niveles de creatinina (B), urea (C) y albúmina (D) en el suero de ratones control (barras blancas) y PSGL-1^{-/-} (barras negras). Las barras representan la media \pm EEM (8-12 ratones por grupo). * = $P \leq 0.05$ mediante el test de la t de Student.

1.4 Desarrollo de neumonía intersticial no específica

En humanos, los casos más graves de esclerodermia desarrollan neumonía intersticial no específica (NINE) fibrótica, que se caracteriza por la presencia de infiltrados inflamatorios y fibrosis en el intersticio alveolar (Herzog et al., 2014). El análisis histológico de secciones del pulmón de los ratones control y PSGL-1 KO mostró que los ratones deficientes en PSGL-1 mayores de 12 meses presentaban un incremento de la celularidad intersticial y engrosamiento del espacio intersticial, semejante a la NINE en humanos (Fig. 25, paneles superiores). La tinción IHQ con anti-CD45 identificó las células intersticiales como leucocitos infiltrantes (Fig. 25, paneles centrales), mientras que la tinción con TM reveló un incremento en la cantidad de colágeno de los septos interalveolares (Fig. 25, paneles inferiores).

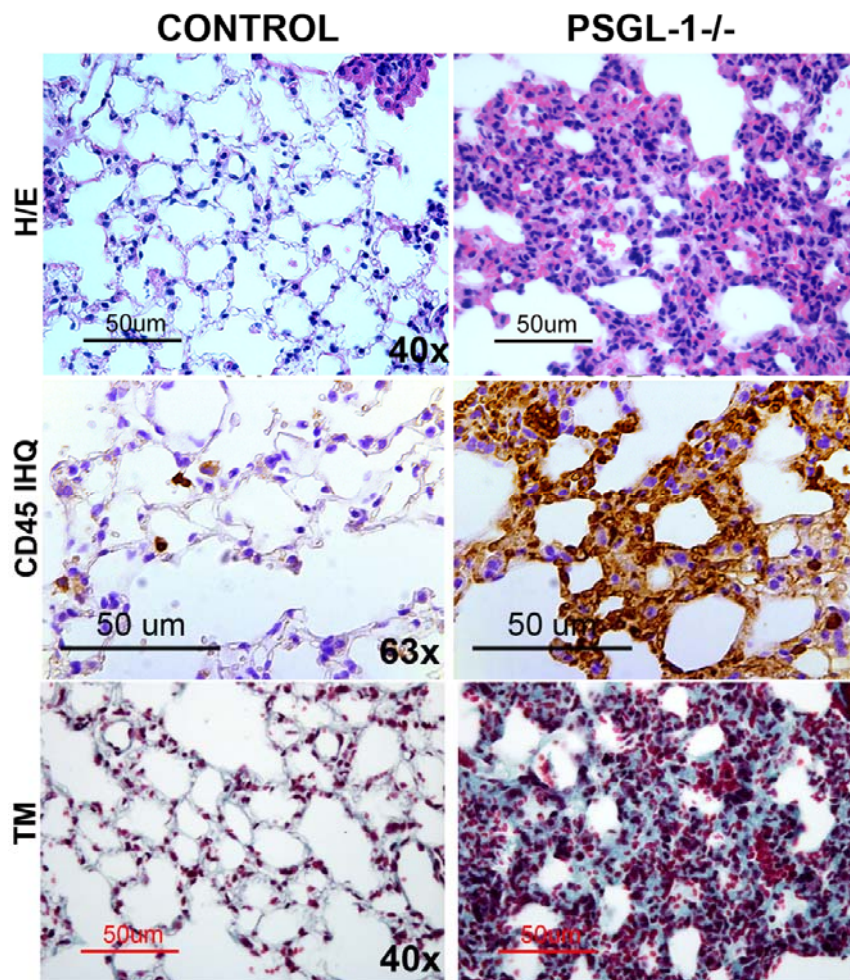


Fig. 25 Fotografías representativas de secciones de pulmón de ratones control y PSGL-1 KO, de 23 meses de edad, teñidas con H/E (40x, paneles superiores), anti-CD45 (63x, paneles centrales) y tricrómicro de Masson (TM) (40x, paneles inferiores).

La cuantificación de la presencia de las lesiones de la NINE en los ratones mostró que ya en el grupo de 1.5-3 meses de edad el 7.8% de los machos y el 16.7% de las hembras PSGL-1^{-/-} tenían neumonía intersticial no específica (Fig. 26). A los 12-24 meses, la NINE se encontró en el 64.7% de los machos y el 53.8% de las hembras PSGL-1^{-/-}, pero sólo en el 14.3% de las hembras control (Fig. 26). Sin embargo, no hemos encontrado diferencias significativas en el contenido de colágeno del pulmón (Fig. 27).

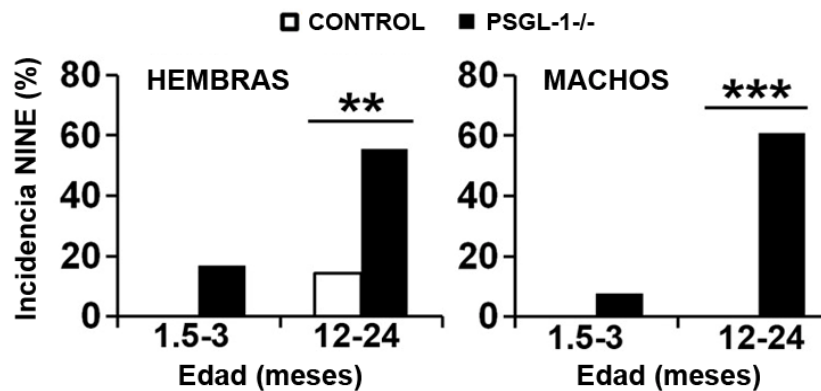


Fig. 26 Porcentaje de ratones control y PSGL-1^{-/-} con neumonía intersticial no específica (NINE) en ratones jóvenes y en ratones mayores de un año (n = 9-23 ratones por grupo). ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.005$ mediante el test chi cuadrado.

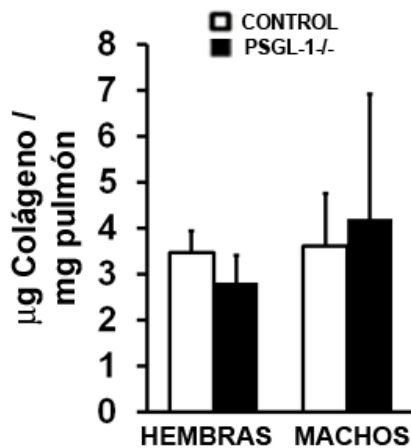


Fig. 27 Cuantificación de la concentración de colágeno soluble en el pulmón de ratones control y PSGL-1^{-/-} de 8 meses de edad mediante el ensayo del Sircol (n = 4 ratones por grupo). Las barras representan la media \pm DE. El análisis se ha realizado mediante el test de la U de Mann-Whitney.

Al igual que en el caso del riñón, no detectamos diferencias en el peso de los pulmones a los 3 meses de edad, pero sí un aumento de peso en los pulmones PSGL-1 KO de 12 meses de edad (Fig. 28A). Los pulmones de las hembras PSGL-1 KO de 12 meses, normalizados en base al peso total del ratón, pesaban más que los ratones control equivalentes (Fig. 28B). Curiosamente no sucede lo mismo en el caso de los machos de

la misma edad, a pesar de que vimos anteriormente una alta frecuencia de ratones con pulmones infiltrados en ambos sexos (Fig. 26). La presencia de fibrosis podría estar contribuyendo al aumento de peso aunque la cuantificación del colágeno no resultara concluyente (Fig. 27), ya que sólo se medía el colágeno soluble.

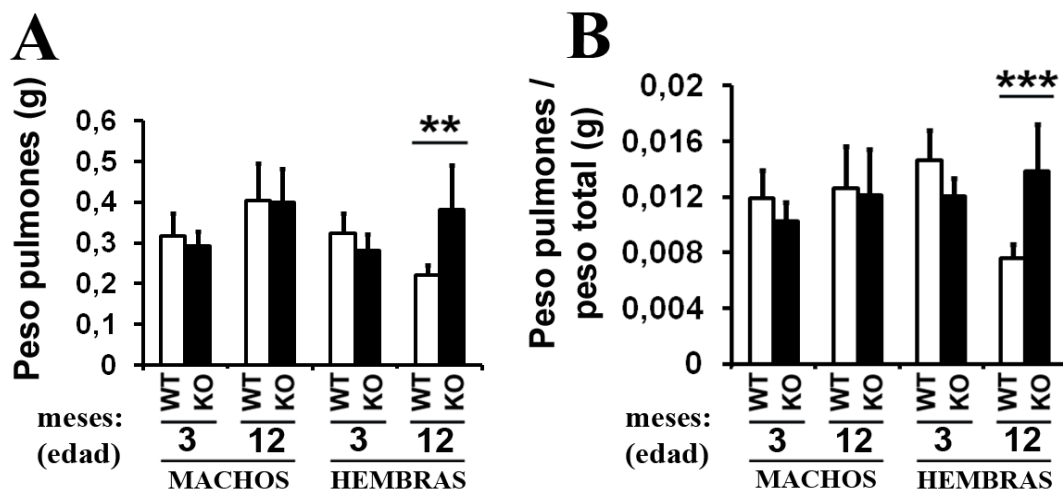


Fig. 28 Medidas del peso de los pulmones (A) y de la relación entre el peso de los pulmones y el peso total del ratón (B) en ratones control (WT) y PSGL-1 KO de 3 y 12 meses (n = al menos 3 ratones por grupo). Peso medio expresado en gramos. Las barras representan la media \pm DE. ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.005$. La significación estadística se ha determinado mediante el test de la t de Student.

1.5 Vasculopatía en piel, riñón y pulmón

Una característica fundamental de los pacientes con esclerodermia es la afectación vascular que se manifiesta, entre otras cosas, por una reducción en la densidad de los capilares de la piel (Distler et al., 2006), por lo que en nuestro modelo realizamos también estudios IHQ con anticuerpo anti-CD31 para visualizar el endotelio vascular (Fig. 29). Así, el número de vasos encontrados en la dermis de los ratones PSGL-1^{-/-} era significativamente menor que en los ratones control, particularmente en la dermis superior (Fig. 30), coincidiendo así con la patología vascular que aparece en la piel de los enfermos con esclerodermia.

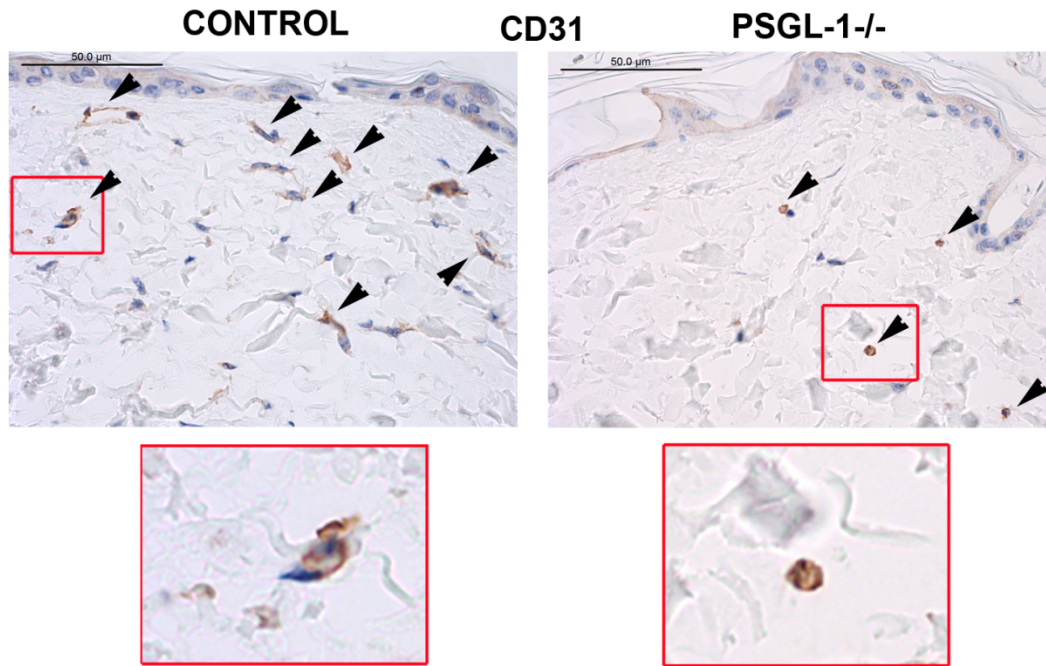


Fig. 29 Microfotografías hechas con el objetivo 40x de secciones representativas de la dermis superior de ratones control y PSGL-1^{-/-} teñidas con anticuerpo anti-CD31. Las puntas de flecha indican los vasos sanguíneos. Las áreas recuadradas en las fotografías de los paneles superiores se muestran debajo con mayor magnificación (zoom 300%) para visualizar mejor la microarquitectura vascular.

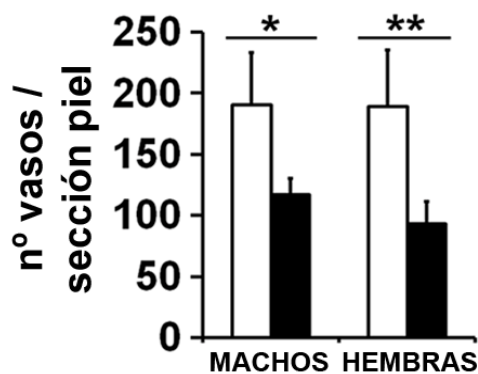


Fig. 30 El gráfico de barras muestra el número de vasos positivos para CD31 en una sección de dermis de 1727 μm de longitud de ratones control (barras blancas) y PSGL-1 KO (barras negras), machos y hembras, de 23 meses de edad (n = 4 ratones por grupo). Las barras representan la media ± DE. * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$ mediante el test de la t de Student.

Dado que en los riñones de los ratones PSGL-1 KO habíamos detectado la presencia de eventos isquémicos que provocan infartos y que los infiltrados intersticiales alteran la estructura del pulmón, procedimos a valorar la presencia de alteración vascular en estos órganos. Para ello, y dado que en la forma más severa de la esclerodemia, debido al aumento de la fibrosis, tiene lugar un aumento de la resistencia

al flujo que puede provocar el remodelado de la pared de los vasos pequeños, realizamos tinciones con anti- α SMA (actina de músculo liso) en secciones histológicas de estos órganos, con objeto de poder visualizar, medir y comparar el grosor de la pared de los vasos. A continuación, mediante el programa ImageJ medimos el espesor de la capa vascular media de los vasos pequeños en el pulmón (Fig. 31) y en el riñón (Fig. 32).

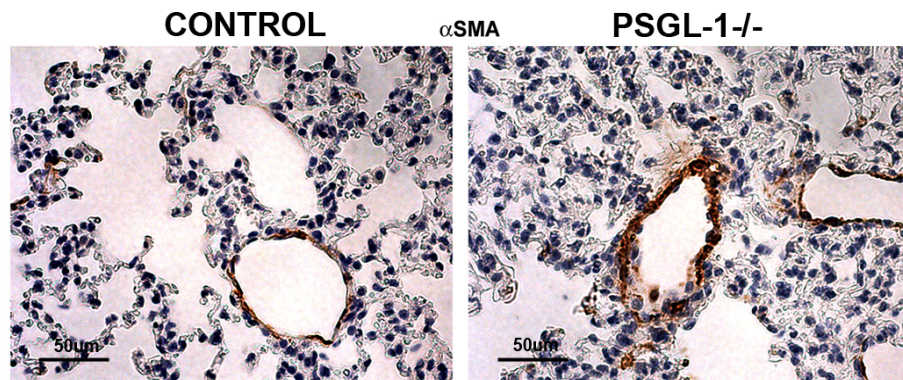


Fig. 31 Microfotografías representativas de secciones de pulmón teñidas con anticuerpo anti- α SMA en ratones control y PSGL-1^{-/-} de 3 meses de edad (40x).

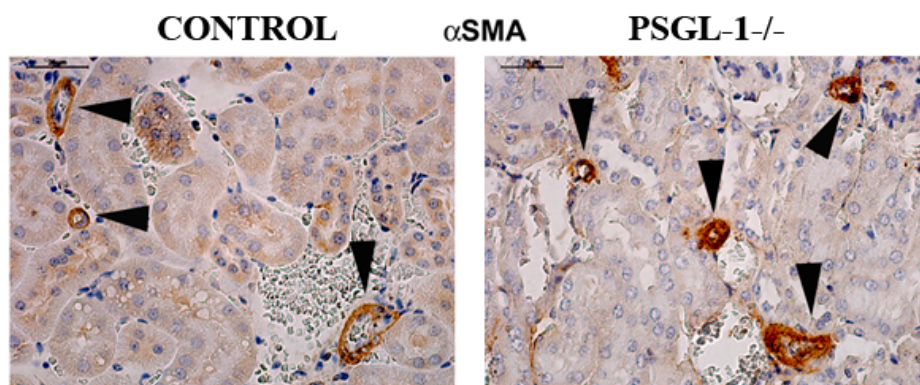


Fig. 32 Microfotografías representativas de secciones de riñón teñidas con anti- α SMA en ratones control y PSGL-1 KO de 3 meses (40x), en las que las puntas de flecha señalan los vasos sanguíneos.

Las medidas obtenidas indicaron que en los ratones que carecen de PSGL-1, la capa media de los vasos pequeños del riñón y el pulmón se encontraba más engrosada que en los ratones control, indicando proliferación de las células musculares. En el caso del riñón, el área ocupada por la capa media, respecto al área total del vaso, era un 10%

mayor en los ratones macho PSGL-1 KO, y un 13% en las hembras (Fig. 33). En cuanto al pulmón, la capa media de los vasos pequeños, respecto al área total del vaso, era un 69% más gruesa en las hembras PSGL-1 KO que en las hembras control, mientras que era un 36% más gruesa en los machos PSGL-1 KO que en los controles (Fig. 34).

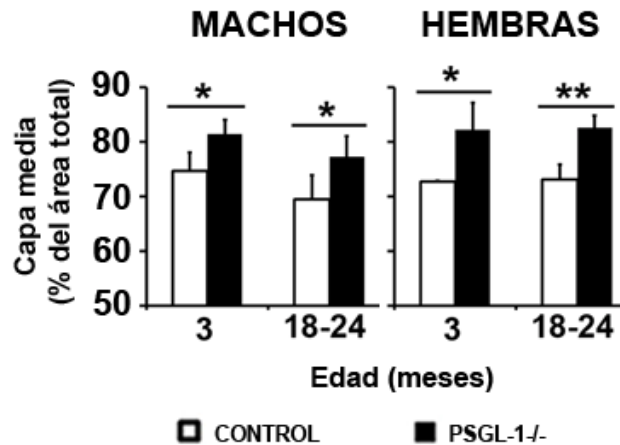


Fig. 33 Porcentaje del área de la pared del vaso respecto al área vascular total, de los vasos renales con diámetro menor de 20 μ m de ratones control (barras blancas) y PSGL-1 KO (barras negras) de 3 meses y 18-24 meses de edad. Las barras muestran la media \pm DE (n= mínimo 4 ratones por grupo, y al menos 25 vasos por ratón). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$ mediante el test de la t de Student.

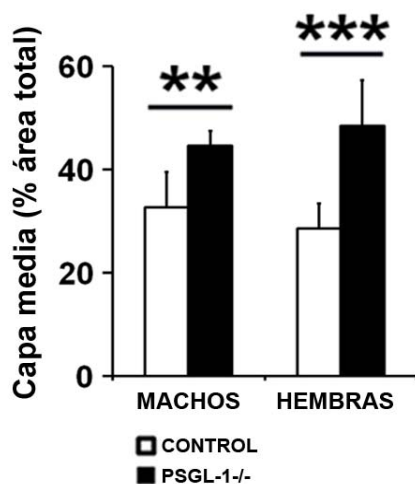


Fig. 34 Cuantificación del porcentaje del área de la pared del vaso respecto al área total, en los vasos menores de 50 μ m de diámetro a nivel pulmonar. Las barras muestran la media \pm DE (n= mínimo 4 ratones de 3 meses de edad y al menos 140 vasos por grupo). ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.005$. Analizado mediante el test de la t de Student.

1.6 Miopatía y problemas metabólicos

En el presente modelo, hemos observado también que los ratones PSGL-1^{-/-} de 3 meses no eran capaces de mantener estiradas las patas traseras (Fig. 35), lo que sugería que podrían presentar debilidad muscular, algo muy frecuente en los enfermos de esclerosis sistémica. Dado que encontramos que los ratones PSGL-1 KO presentaban altos niveles del autoanticuerpo anti-Jo-1 que se asocia con polimiositis, para valorar si presentaban algún tipo de miopatía realizamos análisis histológicos y bioquímicos específicos. La tinción de H/E no mostró diferencias entre los ratones control y los PSGL-1 KO.

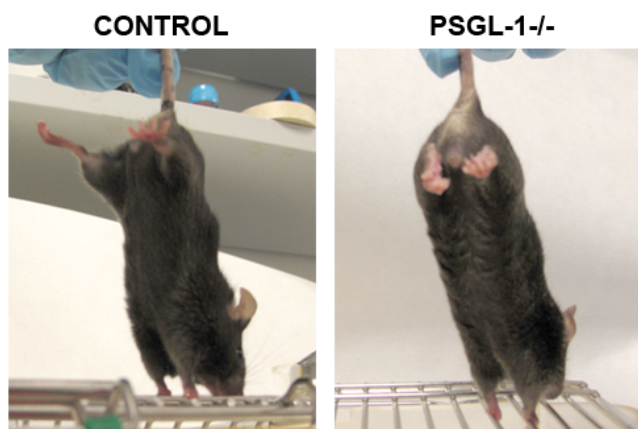


Fig. 35 Fotografías de ratones control y PSGL-1 KO de 3 meses mostrando la incapacidad de mantener estiradas las patas traseras de estos últimos.

Sin embargo, ya que hay miopatías que no cursan con inflamación pero presentan daño muscular que conllevan el aumento en la sangre de las enzimas CK y AST, analizamos la concentración de estas enzimas en el suero de los ratones. Los análisis bioquímicos mostraron niveles elevados tanto de creatina quinasa (CK) como de aspartato aminotransferasa (AST) en el suero de los ratones PSGL-1^{-/-} de 3 meses de edad (Fig. 36), lo que unido a la debilidad muscular indica una miopatía autoinmune subyacente, aunque no se encontraron cambios histológicos importantes en los músculos analizados.

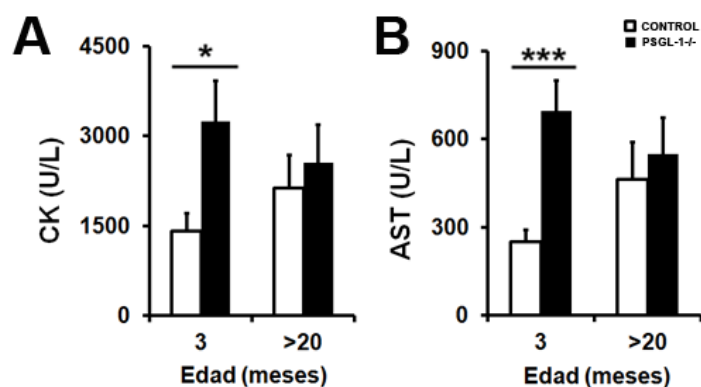


Fig. 36 Niveles en suero de las enzimas creatina quinasa (CK) (A) y aspartato aminotransferasa (AST) (B) de animales control y PSGL-1^{-/-}. Las barras representan la media \pm EEM. Analizados al menos 10 ratones por grupo, mediante el test de la U de de Mann-Whitney. * = $P \leq 0.05$; *** = $P \leq 0.005$.

Además de los valores de CK y AST, se midieron también los valores de glucosa y colesterol en el suero. Los ratones PSGL-1^{-/-} jóvenes tenían menor cantidad de glucosa y colesterol en el suero, lo que sugería podían tener un metabolismo glucolipídico más activo (Fig. 37). Con objeto de detectar posibles problemas metabólicos, monitorizamos durante 5 días seguidos a grupos de ratones machos y hembras de 3 y 23 meses de edad, midiendo diariamente el peso de los ratones, la cantidad de comida ingerida y el peso de sus deposiciones. A los 3 meses de edad, los ratones PSGL-1 KO tenían una relación normal entre estos tres parámetros: mayor ingesta de comida, mayor peso corporal y sus deposiciones pesaban más (Fig. 38A). Sin embargo, los ratones PSGL-1 KO de 23 meses de edad pesaban menos que los ratones control aunque la cantidad de comida ingerida era mayor, lo que podría ser consecuencia de un metabolismo más activo y/o de problemas de malabsorción intestinal (Fig. 38B), ya que sus deposiciones pesaban un poco más.

RESULTADOS

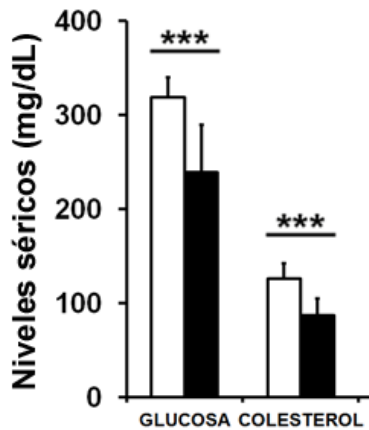


Fig. 37 Niveles en suero de glucosa y colesterol de ratones control (barras blancas) y PSGL-1^{-/-} (barras negras) de entre 4 y 8 meses de edad (al menos 6 ratones por grupo). Las barras representan la media \pm DE. *** = $P \leq 0.005$. La significancia estadística se ha determinado mediante el test de la t de Student.

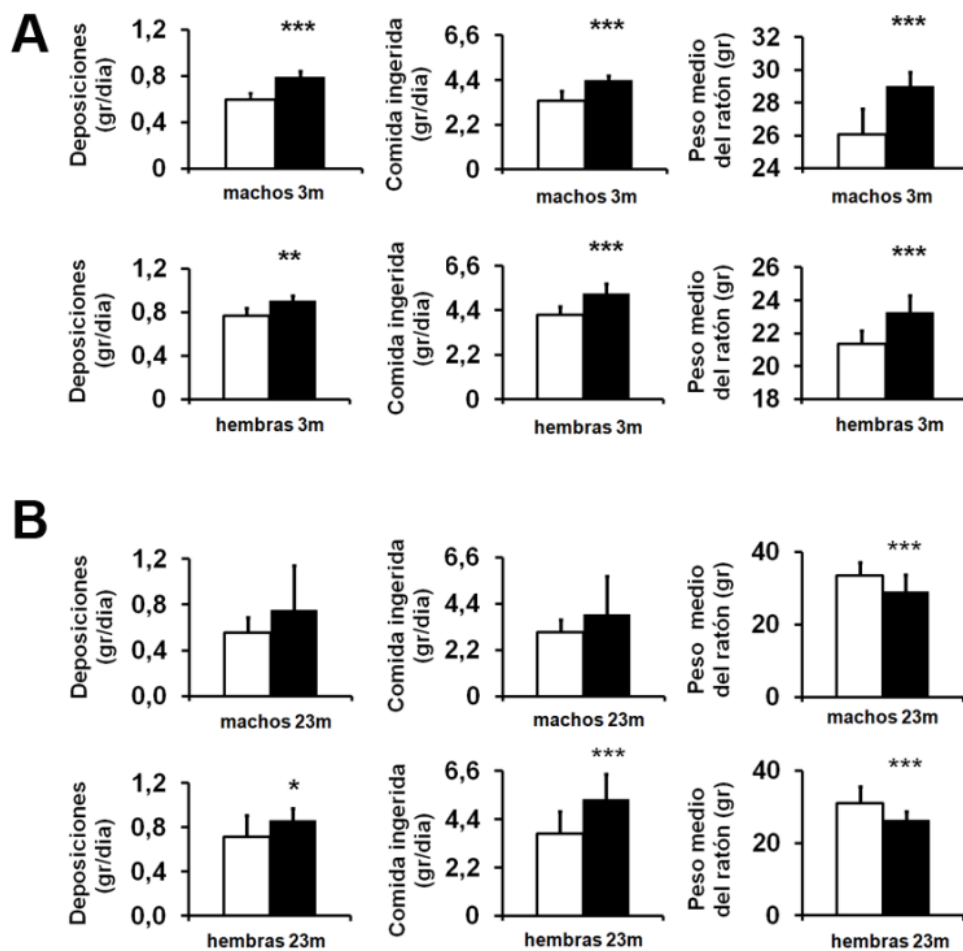


Fig. 38 Gráficos que representan la media por ratón de las mediciones diarias del peso corporal, la ingesta de comida y el peso de las deposiciones realizadas durante 5 días seguidos en ratones control (barras blancas) y PSGL-1^{-/-} (barras negras) de 3 meses de edad (A) y 23 meses de edad (B) (5-7 ratones por grupo). Las barras representan la media \pm DE. * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.005$ mediante el test de la t de Student.

1.7 Aumento en la tasa de mortalidad

El análisis del peso corporal de los ratones a lo largo de los 2 primeros años de vida, mostró que durante el primer año, tanto los machos como las hembras control y PSGL-1^{-/-} presentaban un aumento gradual de peso. Sin embargo, durante el segundo año de vida, mientras los animales control seguían ganando peso, los machos PSGL-1 KO empezaban a perder peso a los 15 meses (Fig. 39A), y las hembras PSGL-1^{-/-} dejaban de ganar peso a los 12 meses y empezaban a perderlo alrededor de los 18 meses (Fig. 39B). Como consecuencia, cuando alcanzaban los 2 años los ratones PSGL-1 KO habían perdido un 20% de su masa corporal, un signo de deterioro general progresivo y caquexia.

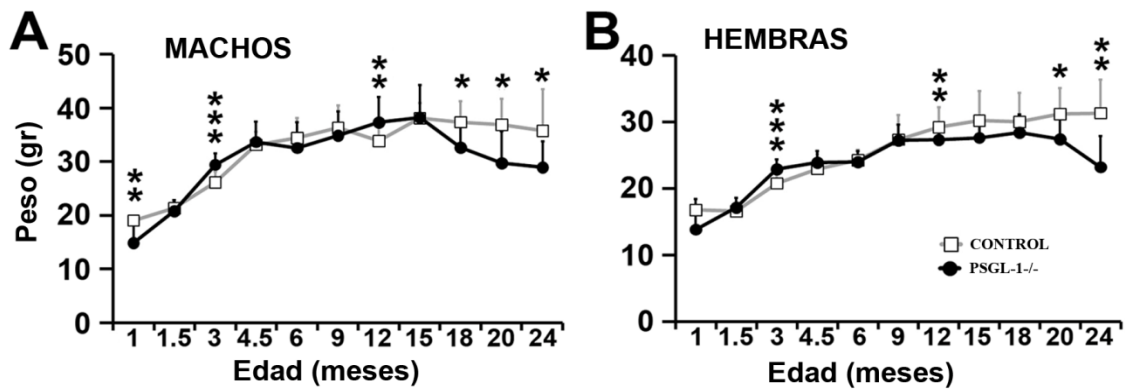


Fig. 39 Cambios en el peso corporal de ratones control y PSGL-1 KO, machos (A) y hembras (B) durante los dos primeros años de vida. Los valores representan la media \pm DE (n= al menos 6 animales por grupo). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.005$ mediante el test de la t de Student.

Para analizar la tasa de mortalidad, se realizó un estudio de supervivencia. El resultado indicó que, mientras los ratones controles tenían una baja tasa de mortalidad durante los dos primeros años, los PSGL-1^{-/-} presentaban dos picos de mortalidad elevada. El primer pico ocurría antes de los 3 meses de edad, durante el cual murieron el 50% de los recién nacidos, pero principalmente en los días posteriores al nacimiento (Fig. 40). Sin embargo, el análisis histológico de la piel, los pulmones y los riñones indicó que los neonatos PSGL-1 KO de 1.5 días de edad no presentaban problemas estructurales o de desarrollo en los órganos analizados. El segundo pico de mortalidad

se daba durante el segundo año de vida, ya que antes de alcanzar los dos años, moría el 60% de la población que alcanzó los doce meses. Como consecuencia, mientras el 70% de los ratones control llegaba a los 2 años, en los PSGL-1^{-/-} el porcentaje se reducía al 20% (Fig. 40).

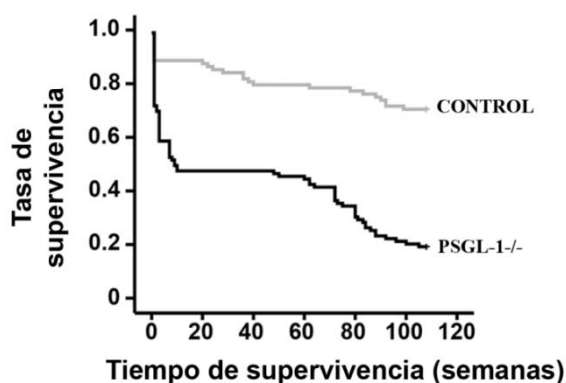


Fig. 40 Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones control (n= 87) y PSGL-1^{-/-} (n=99); $p = 5.2466 \times 10^{-13}$ por el test Mantel-Cox.

1.8 Activación del sistema inmune en los ratones que carecen de PSGL-1

Dado que PSGL-1 es un receptor leucocitario, para evaluar si juega un papel en el mantenimiento de la tolerancia inmune en la piel, se analizaron mediante citometría de flujo las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune residente en la piel, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. En este sentido, encontramos que la mayoría de los macrófagos PSGL-1^{-/-} eran de perfil pro-inflamatorio (Gr1⁺, CD11c⁺), con mayores niveles de expresión de CD69, indicando una mayor activación respecto a los correspondientes macrófagos de control (Fig. 41A).

Del mismo modo, las células dendríticas aisladas de la piel de ratones PSGL-1^{-/-} tenían mayor expresión de la molécula presentadora de antígeno MHC-II y de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD40 que las de la piel de ratones control (Fig. 42A), lo cual revelaba que se encontraban en un estado de mayor activación inmunológica. De acuerdo con estos datos, el porcentaje de macrófagos y células dendríticas productoras de citoquinas proinflamatorias (IL-12, IL-4, IL-17, IFN γ) era mayor en la piel de los ratones PSGL-1^{-/-} que en la de los ratones control (Fig. 41B y 42B).

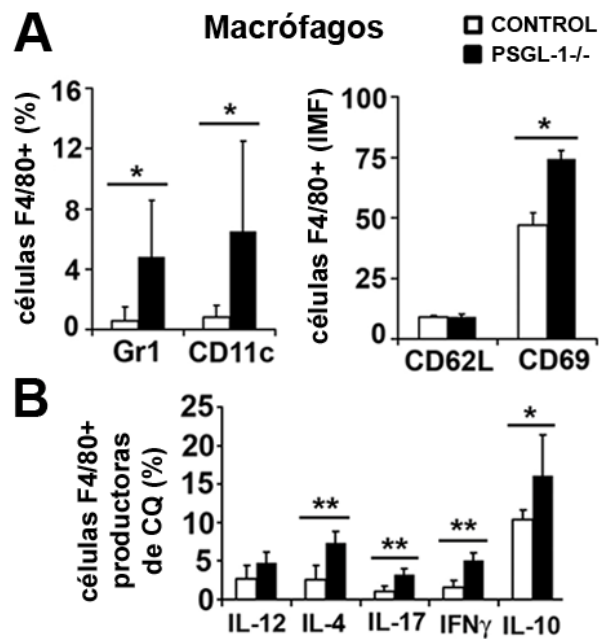


Fig. 41 A) Porcentaje de células Gr1+ y CD11c+ e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) extracelular de CD62L y CD69, dentro de la población F4/80+ aislada de la piel de ratones control y PSGL-1 KO B) Porcentaje de células F4/80+ aisladas de la piel de ratones control y PSGL-1 KO productoras de citoquinas (CQ) intracelulares. Las barras muestran la media \pm DE (n= 4 ratones de 3 meses por grupo). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; mediante el test de la t de Student.

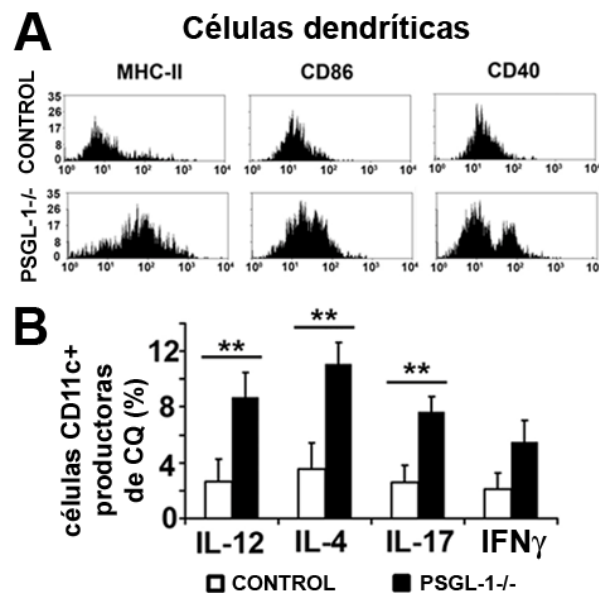


Fig. 42 A) Histogramas que muestran los niveles de expresión extracelular del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), CD86 y CD40 en células dendríticas (CD11c+) obtenidas de la piel de un ratón control y uno PSGL-1^{-/-} representativos (de 4 examinados por grupo). B) Porcentaje de células productoras de citoquinas, dentro de la población CD11c+

RESULTADOS

aislada de la piel de ratones control y PSGL-1 KO. Las barras muestran la media \pm DE (n= 4 ratones de 3 meses por grupo). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; mediante el test de la t de Student.

En cuanto a los linfocitos T efectores de la piel, no se observaron cambios en las poblaciones de linfocitos T CD8+. Sin embargo, en los ratones PSGL-1 KO había más linfocitos T CD4+ que producían IL-4 (Th2), IL-17 (Th17) e IFN γ (Th1). En contraste, los linfocitos T productores de IL-10 y los T reguladores no variaban respecto a los controles, indicando un desequilibrio en la ratio T efector/T regulador hacia un predominio de la activación (Fig. 43). En concordancia con los datos anteriores, encontramos niveles elevados de IL-2, IL-6, IL-13 e IL-22 en el extracto proteico de la piel del ratón PSGL-1^{-/-}, además de una tendencia al aumento de los niveles de IL-10, IL-17 e IL-23 (Fig. 44), confirmando un microambiente proinflamatorio y profibrótico en la piel de los ratones PSGL-1 KO.

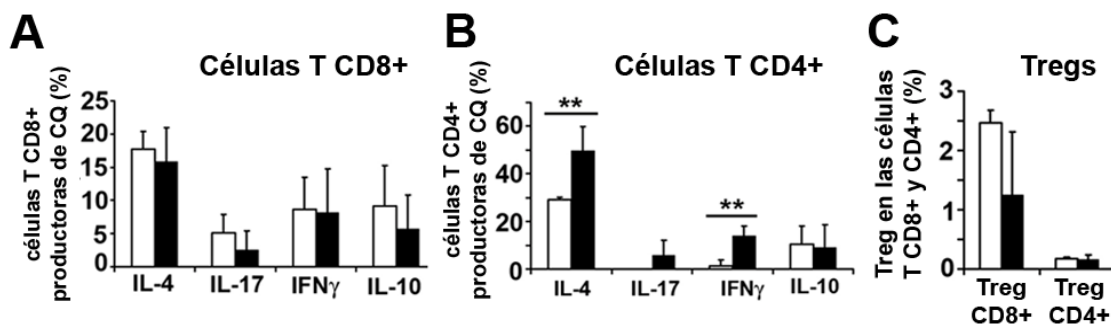


Fig. 43 Porcentaje de células T CD8+ (A) y CD4+ (B) expresando interleuquina 4 (IL-4, Th2), IL-17 (Th17), interferón-gamma (IFN γ , Th1) e IL-10 en la piel de ratones control (barras blancas) y PSGL-1 KO (barras negras) de 3 meses de edad. Derecha, porcentaje de las células T reguladoras (Tregs) (CD25⁺⁺ FoxP3⁺) en las subpoblaciones CD4+ y CD8+. Las barras muestran la media \pm DE (n= 4 ratones por grupo). ** = $P \leq 0.01$; mediante el test de la t de Student.

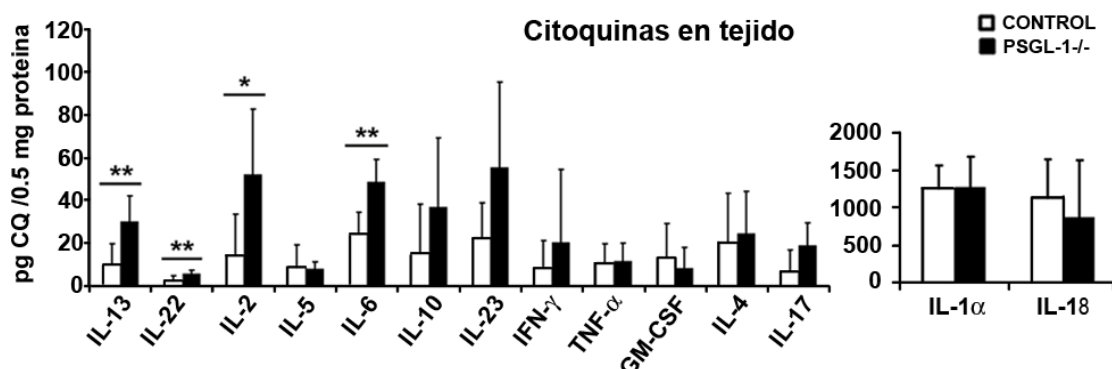


Fig. 44 Concentración de citoquinas en una cantidad de 0.5 mg de proteína total obtenida de la piel de ratones WT y PSGL-1^{-/-} de 3 meses de edad. Las barras muestran la media \pm DE (n= 6 ratones por grupo). * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; mediante el test de la t de Student.

Para investigar si los macrófagos residentes en la piel de los ratones deficientes en PSGL-1 se convertían en macrófagos proinflamatorios y se activaban después de entrar al tejido, o se generaban directamente de precursores medulares con este fenotipo, diferenciamos macrófagos in vitro a partir de precursores de médula ósea provenientes de ratones control y PSGL-1 KO. Los macrófagos obtenidos de ratones PSGL-1^{-/-} tenían un fenotipo proinflamatorio (Gr1⁺⁺ CD11c⁺⁺) y una mayor expresión de CD69 y MHC-II, así como de la integrina LFA-1 (Fig. 45). Además, el perfil de citoquinas mostraba que producían mayor cantidad de IL-17 e IL-4, y una tendencia a mayor IL-12, que los macrófagos derivados de los precursores procedentes de ratones control (Fig. 45). Estos resultados nos indicaban que, en los ratones PSGL-1 KO, los macrófagos se generan con un fenotipo pro-inflamatorio y con mayor estado de activación que en los ratones control.

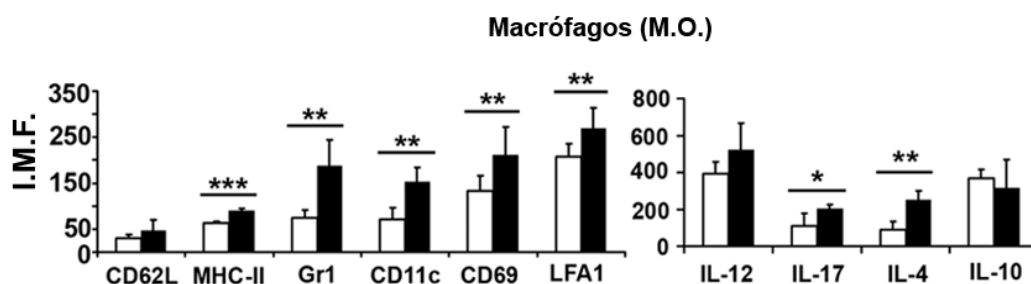


Fig. 45 Expresión en membrana de marcadores moleculares (izquierda) y expresión intracelular de citoquinas (derecha) en macrófagos derivados de precursores aislados de médula ósea (M.O.) de ratones control (barras blancas) y PSGL-1 KO de 3 meses de edad (barras negras) (n = 4 ratones por grupo). Las barras representan la media \pm DE. * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P < 0.005$. La significación estadística se ha determinado mediante el test de la t de Student.

El bazo es el órgano principal en el que se produce la respuesta inmune a los antígenos transportados por la sangre, y además actúa como reservorio de sangre. En este sentido, hemos observado que en los ratones PSGL-1^{-/-}, el bazo es mucho más grande que en los ratones control (Fig. 46A), lo que confirmaría que el sistema inmune del ratón PSGL-1 KO se encuentra más activado y en estado de proliferación, como muestra el aumento de IL-2 en la piel (Fig. 44). En consecuencia, se analizó el peso de los bazos relativo al peso corporal total de los animales y encontramos que, siendo el

peso de los ratones PSGL-1 KO similar al de los ratones control, el tamaño del bazo era mucho mayor en los ratones PSGL-1 KO de 3-12 meses, y la ratio peso del bazo/peso corporal total era mucho mayor en los ratones que carecen de PSGL-1 (Fig. 46B).

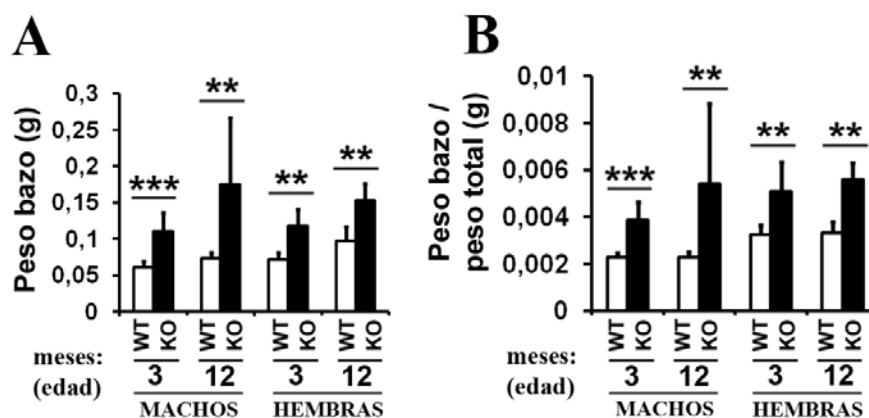


Fig. 46 Medidas del peso del bazo (A) y relación entre el peso del bazo y el peso total del ratón (B) en ratones control (WT, barras blancas) y PSGL-1 KO (barras negras) de 3 y 12 meses de edad (n = al menos 3 ratones por grupo). Peso medio expresado en gramos. Las barras representan la media \pm DE. ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.005$. La significación estadística se ha determinado mediante el test de la U de Mann-Whitney.

2. Estudio de PSGL-1 y sus ligandos en el suero de pacientes con esclerosis sistémica

Para el segundo objetivo de este proyecto nos hemos centrado en las alteraciones que, en este contexto, podrían aparecer en los pacientes afectados de SSc. De hecho, las formas solubles de PSGL-1 y sus ligandos han sido relacionados con la SSc, ya que en pacientes de SSc se ha encontrado cambio en la concentración de PSGL-1 en la sangre (Yanaba et al., 2004) así como de E-selectina (Ihn et al., 1998) y de L-Selectina (Shimada et al., 2001). Ya que nuestro estudio revela que los ratones deficientes para PSGL-1 desarrollan un síndrome autoinmune similar a la dcSSc humana, y dada la controversia encontrada en la literatura respecto a los niveles de las selectina L y P en los pacientes con esclerodermia, quisimos analizar el perfil de estas moléculas característico de cada subtipo de SSc, con el objetivo de establecer un patrón diferencial entre los diferentes fenotipos de SSc. Para ello, cuantificamos mediante ensayos de ELISA las formas solubles de PSGL-1 y sus ligandos, las selectinas P, E y L, en el suero de pacientes de SSc, tanto de la forma limitada (lcSSc) como de la difusa (dcSSc).

RESULTADOS

Para ello, se utilizaron sueros de 9 pacientes con dcSSc, 13 pacientes con lcSSc y 32 voluntarias sanas (controles). Los datos clínicos se presentan en la tabla 1.

	CONTROL	SSc		
		TOTAL	lcSSc	dcSSc
N	32	22	13	9
Edad (años) (media±DE)	43.1±19.7	62.2±15.5	66.1±11.7	56.6±19
NINE (pacientes totales)	0	11 (50)	5 (38)	6 (67)
NINE sin HAP	0	9	3	6
NINE + HAP	0	2	2	0

Tabla 1. Características clínicas de la afectación pulmonar en los pacientes con SSc. NINE: neumonía intersticial no específica. HAP: hipertensión arterial pulmonar. La N indica número de pacientes. Entre paréntesis se indica el porcentaje (%) de pacientes con NINE.

Nuestros resultados indican que las concentraciones de PSGL-1, E-Selectina y L-Selectina en el suero de los pacientes con dcSSc están aumentadas respecto a los valores de los controles sanos (50% mayor en el caso de PSGL-1, 3 veces mayor en el caso de la L-Selectina y el doble en el caso de E-Selectina), mientras que el nivel de P-Selectina es similar al de los controles. Sin embargo, en el caso de los enfermos con lcSSc, los niveles en suero de PSGL-1 y L-Selectina son similares a los de los controles, pero la concentración de P-Selectina es menor y la de la E-Selectina el doble que la de los controles. La selectina E dobla el nivel de los controles en ambos tipos de esclerodermia (Fig. 47). Por tanto, podemos concluir que la dcSSc se caracteriza por una elevación en suero de PSGL-1 y de las selectinas E y L, mientras que la lcSSc se caracteriza por aumento de la selectina E y disminución de la selectina P (Fig. 47).

Debido a que la afectación pulmonar y la renal son las principales causas de mortalidad en la SSc, decidimos analizar si la concentración de estas moléculas solubles podría tener valor pronóstico en estas manifestaciones clínicas. Solamente una de las pacientes tenía insuficiencia renal, y la HAP se presentaba en dos pacientes, por tanto no pudimos obtener datos concluyentes en estos aspectos. Sin embargo, hemos observado que los pacientes de dcSSc sin NINE tienden a tener más sPSGL-1 que aquellos que sí la presentan, que la sE-sel tiende a ser más alta en las pacientes con NINE y la sL-sel está elevada independientemente de la afectación pulmonar. En el caso

de la lcSSc, los pacientes con NINE tienden a tener más sE-sel y menos sP-sel cuando hay afectación pulmonar (Fig. 48).

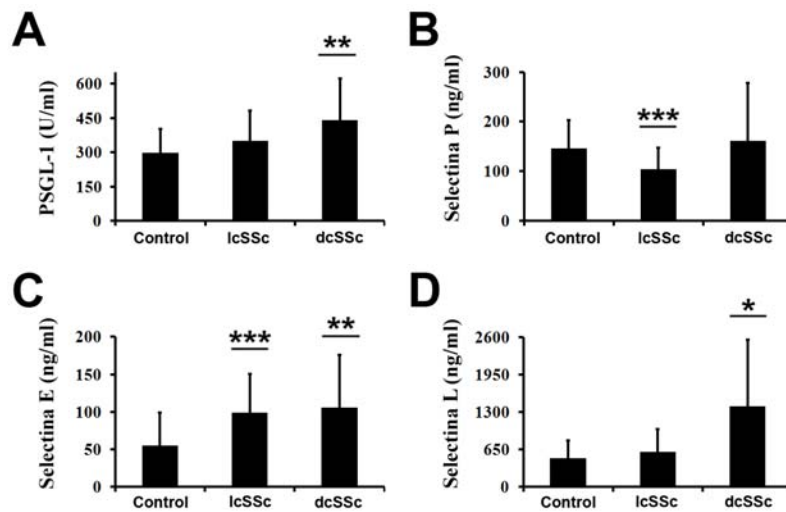


Fig. 47 Cuantificación de las formas solubles de PSGL-1 (A), selectina P (B), selectina E (C) y selectina L (D) en el suero de pacientes femeninos de SSc y en controles. Las barras representan la media \pm DE. * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.005$. La significación estadística se ha analizado mediante la prueba de la U de Mann-Whitney.

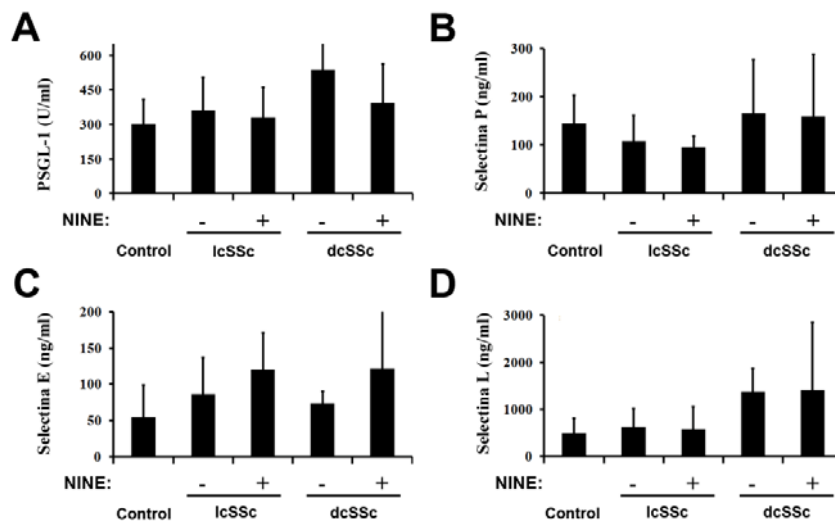


Fig. 48 Cuantificación de las formas solubles de PSGL-1 (A), selectina P (B), selectina E (C) y selectina L (D) en el suero de pacientes de SSc y en voluntarias sanas (controles). Los sueros de las pacientes se han dividido según la presencia (+) o ausencia (-) de NINE. Las barras representan la media \pm DE. La significación estadística se ha analizado mediante el test de la U de Mann-Whitney.

DISCUSIÓN

1. La deficiencia de PSGL-1 en ratones desencadena un síndrome autoinmune similar a la esclerodermia

La esclerodermia es una enfermedad caracterizada por alteraciones inmunológicas, daño vascular y acumulación de colágeno en la piel (Yamamoto, 2009). En esta tesis doctoral se demuestra que el síndrome autoinmune desarrollado por los ratones PSGL-1^{-/-} cumple con los criterios característicos de esta enfermedad, como se desarrolla a continuación.

1.1 Los ratones que carecen de PSGL-1 presentan alteraciones en piel, pulmón y riñón

Una de las principales características de la SSc es la fibrosis cutánea, causada por la gran acumulación de colágeno en la dermis (Bhattacharyya et al., 2011). Los ratones PSGL-1 KO presentan fibrosis dérmica, que se observa en el 67% de los ratones a las 6 semanas de edad, y que aumenta progresivamente con el envejecimiento, como demuestran nuestros datos histológicos. El aumento de grosor de la dermis se produce a expensas de una reducción del espesor de la hipodermis, y hay que destacar que, como ocurre en los pacientes con esclerodermia, se observa además una mayor compactación de las fibras de colágeno que aumenta progresivamente con la edad. Además, la tinción histológica con rojo picrosirius indica un aumento de fibras pequeñas de colágeno, lo que indica que o bien se acumulan fibras maduras de colágeno III o bien son fibras de nueva formación de colágeno I que todavía no han madurado, lo que indicaría una activación de los fibroblastos que estarían produciendo mayor cantidad de colágeno que los ratones control, conduciendo a su acumulación. En el caso de los pacientes con esclerodermia es el colágeno I el que se acumula en la piel (Gabrielli et al., 2009).

La cuantificación del colágeno de la piel mostró una mayor concentración en las hembras jóvenes que carecen de PSGL-1 comparando con sus equivalentes normales. En el resto de grupos encontramos la misma tendencia, pero no llegó a ser significativa, probablemente debido a que el número de ratones analizados es muy bajo y a que el kit utilizado sólo mide el colágeno soluble y con el envejecimiento es más difícil extraer el colágeno de la piel.

En los enfermos de esclerodermia son frecuentes las úlceras digitales, en las que suelen aparecer infiltrados inflamatorios en el área perilesional (Amanzi et al., 2010). También son detectables pequeños infiltrados en las úlceras de los ratones, pero a

diferencia de los humanos, las úlceras no aparecen en las zonas acras debido a la especial estructura y textura de su piel. Sin embargo, al igual que en los pacientes se producen úlceras en las piernas, por estar más expuestas a microtraumatismos, en los ratones se producen úlceras en el lomo y el resto del cuerpo porque todo su cuerpo está expuesto por igual a roces y traumatismos.

Dentro de la patología pulmonar de la SSc, la manifestación más frecuente es la EIP, que afecta al 75% de los pacientes y suele asociarse al subtipo difuso (Bussone and Mouthon, 2011). La mayoría de los casos de EIP son del tipo NINE, caracterizada por fibrosis intersticial e infiltrados inflamatorios (Herzog et al., 2014). Estas mismas características se encuentran en los ratones deficientes para PSGL-1, apareciendo en animales jóvenes en baja proporción pero que aumenta progresivamente llegando a afectar a un porcentaje elevado de los ratones adultos (65% de machos y 54% de hembras) a semejanza de los porcentajes observados en los pacientes. Sin embargo, estos datos no se reflejan adecuadamente en el contenido total de colágeno del pulmón, probablemente debido a que la fibrosis no ocurre de forma tan exacerbada como en la piel, ya que en muchos casos la NINE se presenta de forma focal, no generalizada, y a que el kit utilizado sólo mide colágeno soluble.

La disfunción renal afecta sólo al 30% de los pacientes con SSc (Sticherling, 2012). Esta disfunción renal está caracterizada por trombosis arterial asociada con colapso isquémico glomerular, glomérulos escleróticos y atrofia tubular (Batal et al., 2009; Caron et al., 2012). Los ratones viejos que carecen de PSGL-1 desarrollan eventos isquémicos que promueven la aparición de infartos renales y fibrosis del área afectada. Además, se detecta la presencia de glomérulos escleróticos, glomérulos con tubularización de la cápsula de Bowman y nefritis tubulointersticial. No hemos detectado diferencias significativas en el contenido de colágeno renal probablemente debido a que los focos fibróticos de las áreas infartadas no ocupan una gran extensión, a pesar de lo cual pueden ser relevantes a nivel funcional, y a que el kit utilizado sólo mide el colágeno soluble, como ya se ha mencionado. Otro aspecto importante de la SSc es la inflamación. En los ratones que carecen de PSGL-1, se ha detectado la presencia de infiltrados inflamatorios intersticiales en el 30% de las hembras jóvenes, aunque no en los machos jóvenes, y este porcentaje aumenta progresivamente con la edad, llegando hasta el 80% en la población de ratones mayores de un año.

El fallo renal en la SSc puede causar deterioro de la función filtradora, lo que conlleva la pérdida de sangre y proteínas por la orina, así como el incremento de “productos de desecho” en la sangre, como urea y creatinina (Hinchcliff and Varga, 2008; Rhew and Barr, 2004; Roberts et al., 2002). Hemos detectado proteinuria en el 15% de los ratones PSGL-1 KO a partir de los 18 meses de edad, en coincidencia con el 16% de pacientes con proteinuria hallado por Husssein (Hussein et al., 2005), así como hematuria en el 50% de esos ratones. Ya a partir de los 3 meses de edad, los ratones que carecen de PSGL-1 tienen mayor concentración de urea y creatinina en sangre y se observa una tendencia a la disminución de albúmina. En conjunto, estos parámetros indican una alteración de la función renal en los ratones KO similar a lo que ocurre en los pacientes con esclerosis sistémica.

1.2 Vasculopatía, miopatía y trastornos metabólicos en los ratones que carecen de PSGL-1

Los pacientes con SSc desarrollan lesiones vasculares en los vasos de pequeño y mediano calibre, caracterizadas por proliferación concéntrica de la capa íntima, hiperplasia de la capa media, fibrosis de la adventicia y obliteración del lumen (Steen et al., 2009; Trojanowska, 2010). Además, se produce una pérdida de capilares que no es compensada debido a defectos en la angiogénesis y vasculogénesis (Manetti et al., 2010). Las complicaciones vasculares provocan la generación de úlceras, fenómeno de Raynaud y disfunción de órganos internos debido al flujo sanguíneo reducido (Rabquer and Koch, 2012). Como hemos mostrado en los resultados, la deficiencia de PSGL-1 en ratones provoca una reducción del 50% en los vasos sanguíneos de la dermis, eventos isquémicos en los riñones y engrosamiento de la capa muscular de los vasos pulmonares y renales, sugiriendo que PSGL-1 podría contribuir al mantenimiento de la homeostasis y el remodelado vascular. A diferencia de la enfermedad humana, no hemos detectado fibrosis de las capas íntima y adventicia. Sin embargo, se ha descrito que el engrosamiento de la capa media muscular y la proliferación invasiva de las células de músculo liso en la íntima son un hallazgo muy importante en la patogenia de la HAP. La hipertrofia de la capa media en la microvasculatura contribuye a la elevación sostenida de la resistencia vascular pulmonar y al incremento de la presión arterial (Wilson et al., 2015).

Por otra parte, y aunque se expusieron las patas de los ratones al frío para intentar desencadenar fenómenos de isquemia periférica, no hemos observado el fenómeno de Raynaud en los ratones PSGL-1 KO, posiblemente debido a la especial textura y estructura de la piel y anejos endurecidos de las patas del ratón (Hinchcliff and Varga, 2008).

En general, no hemos encontrado diferencias entre machos y hembras en cuanto a la vasculopatía, salvo en el caso de los infartos renales que parece haber mayor incidencia en los machos, y el engrosamiento de la capa media de los vasos pulmonares, donde el incremento sobre los controles del mismo sexo es mayor en las hembras.

Al igual que algunos pacientes con SSc presentan miopatía (Toledano et al., 2012), los ratones de 3 meses de edad que carecen de PSGL-1 presentaban debilidad muscular, manifestada por la incapacidad de mantener estiradas las patas traseras, y elevación en sangre de las enzimas AST y CK que se asocia al daño muscular. No detectamos signos de miositis a nivel histológico posiblemente por el bajo número de ratones empleados. Además, hay que tener en cuenta que la presencia de fibrosis e inflamación muscular sólo ocurre en parte de los pacientes, y la mayoría presentan síntomas moderados que no hacen necesaria la biopsia muscular, ya que los hallazgos histológicos de daño muscular son poco relevantes (Ranque et al., 2007). En cuanto a los niveles sanguíneos de CK y AST en los animales de 23 meses de edad, posiblemente no se detectaron cambios significativos porque los ratones deficientes para PSGL-1 que consiguen llegar a la edad adulta son los menos afectados por este síndrome autoinmune y además, con el envejecimiento, también los ratones control comienzan a tener daño muscular y mayores niveles de CK y AST en el suero, por lo que las diferencias que se encuentran son escasas.

Los ratones jóvenes deficientes para PSGL-1 presentan menores niveles de glucosa y colesterol en sangre que los controles, lo que podría indicar un problema de malabsorción intestinal o un aumento de su metabolismo. A esas edades todavía no se manifiestan signos externos, pero el problema se agrava con el tiempo ya que se produce una pérdida progresiva de peso durante el segundo año de vida que llega hasta el 20% del peso corporal total. Los ratones de 23 meses de edad que carecen de PSGL-1 pesan menos que los normales a pesar de que su ingesta es mayor, y sus deposiciones pesan más. Estos datos están en consonancia con síntomas de malabsorción,

malnutrición y pérdida de peso, como los encontrados en los pacientes de esclerodermia (Adnan, 2008; Ortiz-Santamaria et al., 2014), por lo que posiblemente nuestros ratones puedan tener disminuida la absorción intestinal.

Por otro lado, hemos observado que la deficiencia en PSGL-1 ocasiona una alta tasa de mortalidad en los ratones. La mitad de ellos muere durante los primeros días de vida pero no hemos podido identificar problemas estructurales en los pulmones ni en los riñones de los ratones neonatos que explicasen este hecho. Dentro de la población PSGL-1 KO que ha superado el primer año de vida, el 60% no alcanza los dos años de edad, seguramente debido a las alteraciones encontradas en el pulmón y riñón. La disfunción de estos órganos es la principal causa de mortalidad en pacientes, sobre todo los problemas pulmonares (Barnes and Mayes, 2012), ya que los tratamientos actuales han conseguido disminuir la mortalidad de origen renal asociada a la tan temida “crisis renal” (Rhew and Barr, 2004).

1.3 Los ratones PSGL-1 KO tienen el sistema inmune activado

Desde el mes y medio de vida, los ratones PSGL-1 KO desarrollan algunos de los autoanticuerpos descritos en las enfermedades autoinmunes relacionadas con el tejido conectivo, y en animales adultos aumenta la frecuencia de su aparición. La mayoría de los pacientes con SSc tienen un solo tipo de autoanticuerpo de los relacionados con esta enfermedad (Hudson et al., 2010), mientras los ratones que carecen de PSGL-1 pueden presentar varios autoanticuerpos diferentes coexistiendo en el mismo ratón, de forma similar a algunos síndromes de solapamiento humanos (Iaccarino et al., 2013). El autoanticuerpo más prevalente a las 6 semanas de vida fue el anti-Scl-70 o antitopoisomerasa I, que se asocia exclusivamente con la SSc difusa y suele estar relacionado con un mal pronóstico (Hamaguchi, 2010). Precisamente, los ratones de mes y medio de edad positivos para Scl-70 morían antes de los 3 meses de edad. Ninguno de los animales examinados tenía autoanticuerpos contra el dsDNA, marcador de LES (Zhang et al., 2008) ni, sorprendentemente, anticuerpos anti-centrómero, característicos de la SSc limitada (Nihtyanova and Denton, 2010). La presencia del anticuerpo anti-Scl-70 y las alteraciones encontradas en piel, pulmón y riñón son sugestivas de la forma difusa de SSc.

Debido a que la esclerodermia es una enfermedad autoinmune y PSGL-1 un receptor leucocitario, decidimos estudiar el fenotipo de las poblaciones celulares del

sistema inmune residentes en la piel del ratón PSGL-1 KO, por ser el principal órgano afectado de fibrosis. En este sentido, en nuestro modelo hemos encontrado que en la piel de los ratones PSGL-1 KO tanto los macrófagos como las células dendríticas estaban más activados y con un fenotipo pro-inflamatorio y además estaban aumentadas las poblaciones efectoras de macrófagos y células dendríticas productoras de citoquinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e IFN γ . Asimismo, las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ efectores productores de IL-4 (Th2), IL-17 (Th17) e IFN γ (Th1) también estaban aumentadas en los ratones deficientes para PSGL-1, mientras que los linfocitos T reguladores no variaban respecto a los controles. Estos datos indican que la piel de los ratones que carecen de PSGL-1 presenta un desequilibrio en el cociente T efector/T regulador en el que predominan los linfocitos T efectores. Además, encontramos niveles elevados de IL-2, IL-6, IL-13 e IL-22 en el tejido, y una tendencia al aumento de los niveles de IL-10, IL-17 e IL-23. Estas citoquinas profibróticas e inflamatorias también están incrementadas en los pacientes con SSc (Abraham et al., 2009; Díaz and Guzmán, 2009; Radstake et al., 2009). Por otra parte, en los pacientes con SSc también se han descrito niveles elevados de IL-2 en el suero (Derk and Jimenez, 2003) y un mayor número de células productoras de IL-22 en aquellos con EIP (Truchetet et al., 2011). Además, en los pacientes con esclerodermia se ha detectado un aumento en la producción de IFN γ en células mononucleares sanguíneas, mayor activación de la respuesta Th1 y Th2 (Valentini et al., 2001) y aumento de la respuesta Th17 y Th22 (Radstake et al., 2009; Truchetet et al., 2011). Respecto a la piel, nuestros hallazgos concuerdan con los descritos sobre los leucocitos presentes en la piel de pacientes con SSc, ya que en los pacientes se han encontrado aumentados tanto los linfocitos Th2 (Gabrielli et al., 2009) como los Th17 (Bhattacharyya et al., 2011; Truchetet et al., 2011) y activación de los macrófagos y linfocitos T CD4⁺ (Derk and Jimenez, 2003).

Con el fin de dilucidar si el sistema inmune estaba activado basalmente o se activaba al llegar a los tejidos, diferenciamos macrófagos a partir de precursores de médula ósea y pudimos comprobar que los macrófagos PSGL-1^{-/-} obtenidos presentaban un fenotipo activado y proinflamatorio, y producían más IL-4 e IL-17 que los macrófagos generados a partir de precursores medulares de ratones control, lo que sugiere que quizás los monocitos que se generan en la médula de los ratones PSGL-1 KO son más pro-inflamatorios y están más activados que los que se generan en la

médula de los ratones control. Asimismo, se ha descrito que las células dendríticas generadas a partir de precursores medulares también tienen un fenotipo más pro-inflamatorio y activado que las generadas a partir de precursores control (Urzainqui et al., 2007). En conjunto, nuestros datos indican que la deficiencia de PSGL-1 desencadena la activación del sistema inmune que genera una respuesta inflamatoria y profibrótica similar a la encontrada en la SSc humana.

2. Alteración de los niveles de PSGL-1 y selectinas en el suero de pacientes con esclerosis sistémica

Hasta ahora diversos estudios habían establecido el aumento de PSGL-1 y sus ligandos en el suero de pacientes con esclerodermia humana (Ates et al., 2004; Yanaba et al., 2004). La importancia de PSGL-1 en esta enfermedad corroborada por nuestro modelo en ratón por un lado, y la controversia generada por los datos relativos a las selectinas P y L por otro, nos llevaron a trazar un perfil de los cambios asociados a estas moléculas en la SSc. Nuestro objetivo perseguía contribuir al diagnóstico diferencial de los subtipos limitado y difuso, mediante el análisis de estas moléculas en el suero de los pacientes con SSc.

En este sentido, se ha descrito un incremento de sPSGL-1 en el suero de pacientes con colitis ulcerosa (Ajdukovic et al., 2015) y SSc (Yanaba et al., 2004), dos enfermedades de carácter inflamatorio. Mientras que los datos de Yanaba et al. no muestran diferencias de concentración entre ambos subtipos de esclerodermia, en nuestro caso el aumento de un 50% en la concentración de sPSGL-1 en pacientes con SSc difusa sí ha resultado significativo; si bien hemos observado una tendencia en el mismo sentido en la forma limitada. Yanaba et al. observaron que el aumento de sPSGL-1 se correlacionaba con menor frecuencia y severidad de fibrosis pulmonar, característica de la NINE. A pesar de que nuestros resultados no son estadísticamente significativos, debido al bajo número de pacientes incluidos, hemos observado que los pacientes con dcSSc sin NINE tienden a tener mayor cantidad de PSGL-1 soluble que aquellos que sí la presentan, lo que concuerda con los hallazgos de Yanaba et al.

En cuanto a la sE-sel, hemos detectado que sus niveles doblan a los de los controles en ambos subtipos de SSc. El aumento de esta molécula también fue descrito

en estudios independientes (Ates et al., 2004; Ihn et al., 1998) en asociación con mayor frecuencia de fibrosis pulmonar. Las observaciones sobre el aumento de sE-sel están apoyadas también por otros investigadores (Gruschwitz et al., 1995; Iversen et al., 2013; Kurylczyn-Moskal et al., 2005). En nuestros pacientes, en concordancia con estudios ya publicados, observamos una tendencia a mayor concentración de sE-sel en las pacientes que presentan NINE en ambos subtipos de SSc.

Por el contrario, existe cierta discrepancia respecto a la cuantificación de sL-sel en los diversos estudios publicados. Algunos autores no encuentran cambios en la concentración de sL-sel en el suero de pacientes con SSc (Ates et al., 2004; Sfikakis et al., 1999), otros detectan una disminución (Blann et al., 1996; Dunne et al., 2012) y otros un aumento (Shimada et al., 2001) respecto a la concentración de la L-sel en el suero de los controles sanos. Nuestros resultados indican que la concentración de sL-sel en los pacientes con SSc difusa es casi tres veces superior a la de los controles, mientras que la de los pacientes con SSc limitada es similar a la de los controles sanos, por lo que nuestros resultados están en concordancia parcial con los de Shimada et al, ya que encontraban aumento en ambos subtipos. Quizá la diferencia se deba a que en el estudio de Shimada et al los pacientes eran japoneses y en nuestro estudio el 80% son españoles y el 20% suramericanos.

Respecto a la concentración de la sP-sel, se ha descrito tanto un incremento en el suero de los pacientes con SSc (Blann et al., 2003a; Gruschwitz et al., 1995; Iversen et al., 2013; Sfikakis et al., 1999) como ausencia de cambio (Ates et al., 2004). En contraste, nosotros hemos detectado una disminución del 28% en la concentración de sP-sel en el suero de los pacientes con SSc limitada, pero no hemos observado diferencias en los pacientes con esclerodermia difusa.

Tras estos análisis, podríamos concluir que los subtipos de SSc difieren en 3 de las 4 moléculas estudiadas por lo que el análisis de sPSGL-1 y las selectinas solubles podrían contribuir, como biomarcadores, al diagnóstico diferencial entre ambos subtipos de SSc, ya que solo coinciden en el incremento de la selectina E. La SSc difusa se caracteriza por la elevación de PSGL-1 y la selectina L, y la SSc limitada por la disminución de la selectina P. Además, los datos preliminares indican que en las pacientes con SSc difusa, el aumento de PSGL-1 podría relacionarse con ausencia de

NINE mientras que el aumento de sE-sel indicaría presencia de NINE en ambos subtipos, por tanto estas moléculas podrían tener valor pronóstico en la afectación pulmonar. Además, PSGL-1 y las selectinas podrían representar dianas terapéuticas diferenciales para un tratamiento más específico de los distintos tipos de esclerodermia.

3. Carencia de modelos animales completos en ratón de la esclerosis sistémica

La vasculopatía, fibrosis, inflamación y autoinmunidad son las alteraciones principales de la SSc. Varios modelos en ratón y aviares han sido desarrollados para el estudio de diferentes aspectos de esta enfermedad (Fig. 49), pero ninguno de ellos abarca todos los aspectos de la SSc, solo la fibrosis es el denominador común a todos ellos (Beyer et al., 2010).

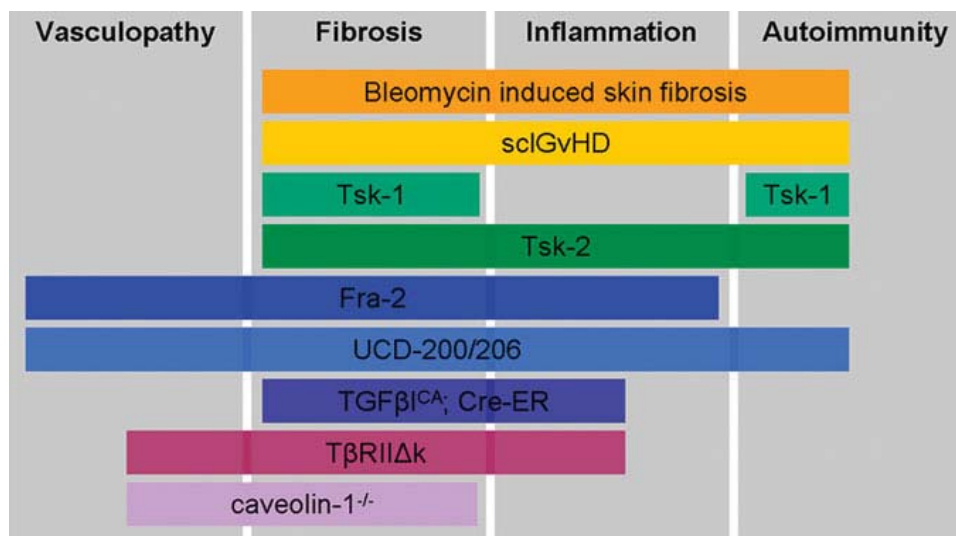


Fig. 49 Procesos patológicos principales en la SSc y su representación en diferentes modelos animales. Imagen tomada de Beyer et al., 2010

Recientemente se ha descrito un modelo de ratón bastante completo que combina la baja expresión de Fli1 y KLF5 (Noda et al., 2014) y parece agrupar las principales características de la SSc. Pero en cuanto a la activación del sistema inmune, Noda et al. solo demuestran la activación de los linfocitos B con sobreproducción de IL-

6, mientras nosotros aportamos una perspectiva más amplia mostrando la activación de macrófagos, células dendríticas y linfocitos en la piel que producen una gran variedad de citoquinas pro-inflamatorias, ya que la activación de los linfocitos B la mostramos mediante la presencia de distintos autoanticuerpos. Si bien Noda et al. detectan anticuerpos antinucleares, no encuentran aumento respecto a los controles en la cantidad del anticuerpo anti-topoisomerasa I (Scl70), específico de la SSc difusa. En cambio, nuestro grupo sí ha detectado incremento de este autoanticuerpo en los ratones PSGL-1 KO. Por otro lado, el modelo de ratón que carece de PSGL-1 es más completo al incluir disfunción renal, miopatía y pérdida de peso, como ocurre en los pacientes de SSc, ya que en el modelo de Noda et al. no se menciona la afectación renal, que constituye una parte importante de esta enfermedad.

En esta tesis se propone al ratón que carece de PSGL-1 como el modelo más completo en la actualidad para estudiar la SSc ya que presenta las principales características prototípicas de la enfermedad (fibrosis, inflamación, vasculopatía, autoinmunidad, afectación pulmonar y renal) en un síndrome progresivo desarrollado espontáneamente que se asemeja a la SSc difusa. Es cierto que existen algunas diferencias entre nuestro modelo y la enfermedad humana, que podrían deberse a que se trata de especies diferentes y los órganos son estructuralmente diferentes en ambos casos, o a la completa ausencia de PSGL-1 en el ratón, hecho aún no descrito en humanos. La carencia completa de PSGL-1 en el ratón podría explicar el desarrollo tan temprano de este síndrome, en comparación con la esclerodermia humana, que suele diagnosticarse en épocas más tardías de la vida. El trabajo aquí presentado sugiere que quizás la expresión de PSGL-1 y sus ligandos podría estar alterada en los pacientes desde edades mucho más tempranas, aunque los pacientes no muestren fibrosis en la piel, el signo clínico por excelencia que da paso al diagnóstico de la enfermedad. Por eso destacamos la relevancia que podría tener PSGL-1 en el diagnóstico temprano, lo que permitiría abordar la enfermedad desde las fases iniciales, al poner los tratamientos adecuados y evitar la afectación y alteración estructural de los órganos internos.

CONCLUSIONES

1. La ausencia de PSGL-1 en ratones provoca alteraciones en la piel y órganos internos. En la piel se desarrolla fibrosis por acumulación de colágeno en la dermis, se produce lipoatrofia y se generan úlceras superficiales estériles. Los pulmones resultan afectados por la neumonía intersticial no específica, que se caracteriza por la presencia de fibrosis e infiltrados inflamatorios. En el riñón también se producen infiltrados inflamatorios, además de glomeruloesclerosis e infartos renales.
2. En el ratón PSGL-1 KO se producen alteraciones vasculares en la piel, pulmón y riñón, manifestadas por la reducción en el número de vasos sanguíneos de la piel y por el engrosamiento de la capa muscular de los vasos pequeños renales y pulmonares, lo que conduce a una disminución del flujo sanguíneo en estos tejidos. Además, estos ratones presentan miopatía, alteraciones metabólicas y una elevada tasa de mortalidad.
3. Los ratones que carecen de PSGL-1 presentan autoanticuerpos circulantes relacionados con enfermedades del tejido conectivo, entre los que se encuentra el anti-Scl 70, característico de la esclerosis sistémica difusa.
4. En la piel de los ratones PSGL-1 KO, las poblaciones de macrófagos y células dendríticas con fenotipo pro-inflamatorio se encuentran aumentadas y más activadas, y también están aumentados los linfocitos T CD4⁺ Th1, Th2 y Th17. Como consecuencia, la concentración de citoquinas inflamatorias y profibróticas en el tejido se encuentra muy elevada. El sistema inmune de estos ratones se encuentra activado antes de llegar a la piel, pues los macrófagos generados a partir de precursores de médula ósea que carecen de PSGL-1 presentan un fenotipo proinflamatorio.
5. La concentración de las formas solubles de PSGL-1 y sus ligandos, las selectinas P, E y L, se encuentra alterada en el suero de pacientes con esclerodermia respecto a los niveles encontrados en los controles sanos. La esclerodermia difusa se caracteriza por la elevación de PSGL-1 y las selectinas E y L. La esclerodermia limitada se caracteriza por una disminución de la concentración de la selectina P y un aumento de la concentración de la selectina E. Por tanto,

PSGL-1 y las selectinas podrían representar dianas terapéuticas diferenciales para un tratamiento más específico de los distintos tipos de esclerodermia.

6. Por todo lo descrito anteriormente, concluimos que el ratón PSGL-1^{-/-} desarrolla un síndrome autoinmune similar a la esclerosis sistémica humana en su forma difusa, de aparición temprana y evolución progresiva. Este síndrome recapitula las principales características de la enfermedad humana, como la fibrosis, vasculopatía, autoinmunidad y activación del sistema inmune. Por todo ello, proponemos que el ratón PSGL-1^{-/-} es un buen modelo para el estudio de la esclerosis sistémica difusa y que la molécula PSGL-1 juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbal, C., Lambelet, M., Bertaggia, D., Gerbex, C., Martinez, M., Arcaro, A., Schapira, M., and Spertini, O. (2006). Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin-dependent rolling under flow conditions. *Blood* 108, 3352-3359.
- Abraham, D.J., Krieg, T., Distler, J., and Distler, O. (2009). Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 48 Suppl 3, iii3-7.
- Adnan, Z.A. (2008). Diagnosis and treatment of scleroderma. *Acta Med Indones* 40, 109-112.
- Ajdukovic, J., Salamunic, I., Hozo, I., Despalatovic, B.R., Simunic, M., Bonacin, D., Puljiz, Z., Trgo, G., Sundov, Z., and Tonkic, A. (2015). Soluble P-selectin glycoprotein ligand - a possible new target in ulcerative colitis. *Bratisl Lek Listy* 116, 147-149.
- Allanore, Y., Batteux, F., Avouac, J., Assous, N., Weill, B., and Kahan, A. (2007). Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 25, 60-66.
- Amanzi, L., Braschi, F., Fiori, G., Galluccio, F., Miniati, I., Guiducci, S., Conforti, M.L., Kaloudi, O., Nacci, F., Sacu, O., et al. (2010). Digital ulcers in scleroderma: staging, characteristics and sub-setting through observation of 1614 digital lesions. *Rheumatology (Oxford)* 49, 1374-1382.
- An, G., Wang, H., Tang, R., Yago, T., McDaniel, J.M., McGee, S., Huo, Y., and Xia, L. (2008). P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. *Circulation* 117, 3227-3237.
- Angiari, S., Rossi, B., Piccio, L., Zinselmeyer, B., Budui, S., Zenaro, E., Bianca, V.D., Bach, S., Scarpini, E., Bolomini-Vittori, M., et al. (2013). Regulatory T cells suppress the late phase of the immune response in lymph nodes through P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Immunol.* 191, 5489-5500.
- Ates, A., Kinikli, G., Turgay, M., and Duman, M. (2004). Serum-soluble selectin levels in patients with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Scand J Immunol* 59, 315-320.
- Azzi, L., El-Alfy, M., Martel, C., and Labrie, F. (2005). Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol* 124, 22-27.

- Baraut, J., Michel, L., Verrecchia, F., and Farge, D. (2010). Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 10, 65-73.
- Barnes, J., and Mayes, M. (2012). Epidemiology of systemic sclerosis: incidence, prevalence, survival, risk factors, malignancy, and environmental triggers. *Curr Opin Rheumatol.* 24, 165-170.
- Batal, I., Domsic, R.T., Shafer, A., Medsger, T.A., Jr., Kiss, L.P., Randhawa, P., and Bastacky, S. (2009). Renal biopsy findings predicting outcome in scleroderma renal crisis. *Hum Pathol* 40, 332-340.
- Beyer, C., Schett, G., Distler, O., and Distler, J. (2010). Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum.* 62, 2831-2844.
- Bhattacharyya, S., Wei, J., and Varga, J. (2011). Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol.* 8, 42-54.
- Blann, A.D., Nadar, S.K., and Lip, G.Y. (2003a). The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 24, 2166-2179.
- Blann, A.D., Constans, J., Carpentier, P., Renard, M., Satger, B., Guerin, V., Boisseau, M.R., Neau-Cransac, N., and Conri, C. (2003b). Soluble P selectin in systemic sclerosis: relationship with von Willebrand factor, autoantibodies and diffuse or localised/limited disease. *Thromb Res* 109, 203-206.
- Blann, A.D., Sanders, P.A., Herrick, A., and Jayson, M.I. (1996). Soluble L-selectin in the connective tissue diseases. *Br J Haematol* 95, 192-194.
- Bullard, D.C., Mobley, J.M., Justen, J.M., Sly, L.M., Chosay, J.G., Dunn, C.J., Lindsey, J.R., Beaudet, A.L., and Staite, N.D. (1999). Acceleration and increased severity of collagen-induced arthritis in P-selectin mutant mice. *J Immunol* 163, 2844-2849.
- Bussone, G., and Mouthon, L. (2011). Interstitial lung disease in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 10, 248-255.
- Carlow, D.A., Gossens, K., Naus, S., Veerman, K.M., Seo, W., and Ziltener, H.J. (2009). PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis. *Immunol Rev* 230, 75-96.

- Caron, M., Hudson, M., Baron, M., Nessim, S., Group, C.S.R., and Steele, R. (2012). Longitudinal study of renal function in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 39, 1829-1834.
- Castellino, F.V., Seiders, J., Bain, G., Brooks, S.F., King, C.D., Swaney, J.S., Lorrain, D.S., Chun, J., Luster, A.D., and Tager, A.M. (2011). Amelioration of dermal fibrosis by genetic deletion or pharmacologic antagonism of lysophosphatidic acid receptor 1 in a mouse model of scleroderma. *Arthritis Rheum* 63, 1405-1415.
- Celi, A., Pellegrini, G., Lorenzet, R., De Blasi, A., Ready, N., Furie, B.C., and Furie, B. (1994). P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8767-8771.
- Chaisson, N.F., and Hassoun, P.M. (2013). Systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* 144, 1346-1356.
- Chizzolini, C., Brembilla, N., Montanari, E., and Truchetet, M. (2011). Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev.* 10, 276-281.
- Cipriani, P., Marrelli, A., Liakouli, V., Di Benedetto, P., and Giacomelli, R. (2011). Cellular players in angiogenesis during the course of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 10, 641-646.
- Cutolo, M., Sulli, A., and Smith, V. (2010). Assessing microvascular changes in systemic sclerosis diagnosis and management. *Nat Rev Rheumatol* 6, 578-587.
- Cuttle, L., Nataatmadja, M., Fraser, J.F., Kempf, M., Kimble, R.M., and Hayes, M.T. (2005). Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picrosirius-polarization. *Wound Repair Regen* 13, 198-204.
- da Costa Martins, P., Garcia-Vallejo, J.J., van Thienen, J.V., Fernandez-Borja, M., van Gils, J.M., Beckers, C., Horrevoets, A.J., Hordijk, P.L., and Zwaginga, J.J. (2007). P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1023-1029.
- Damle, N.K., Klussman, K., Dietsch, M.T., Mohaghehpour, N., and Aruffo, A. (1992). GMP-140 (P-selectin/CD62) binds to chronically stimulated but not resting CD4⁺ T lymphocytes and regulates their production of proinflammatory cytokines. *Eur J Immunol* 22, 1789-1793.
- Davenpeck, K.L., Brummet, M.E., Hudson, S.A., Mayer, R.J., and Bochner, B.S. (2000). Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin

glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) and adhesion to P-selectin in vitro. *J Immunol* 165, 2764-2772.

- Denton, C.P., Zheng, B., Evans, L.A., Shi-wen, X., Ong, V.H., Fisher, I., Lazaridis, K., Abraham, D.J., Black, C.M., and de Crombrughe, B. (2003). Fibroblast-specific expression of a kinase-deficient type II transforming growth factor beta (TGFbeta) receptor leads to paradoxical activation of TGFbeta signaling pathways with fibrosis in transgenic mice. *J Biol Chem* 278, 25109-25119.
- Derk, C.T., and Jimenez, S.A. (2003). Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun Rev* 2, 181-191.
- Díaz, C., and Guzmán, M. (2009). Inmunopatogenia de la esclerosis sistémica. *Rev chil reumatol* 25, 17-24.
- Distler, J., Gay, S., and Distler, O. (2006). Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 45, 26-27.
- Domínguez-Luis, M., Lamana, A., Vazquez, J., García-Navas, R., Mollinedo, F., Sánchez-Madrid, F., Díaz-González, F., and Urzainqui, A. (2011). The metalloprotease ADAM8 is associated with and regulates the function of the adhesion receptor PSGL-1 through ERM proteins. *Eur J Immunol* 41, 3436-3442.
- Dunne, J.V., van Eeden, S.F., and Keen, K.J. (2012). L-selectin and skin damage in systemic sclerosis. *PLoS One* 7, e44814.
- Estrada-Capetillo, L., Hernández-Castro, B., Monsiváis-Urenda, A., Alvarez-Quiroga, C., Layseca-Espinosa, E., Abud-Mendoza, C., Baranda, L., Urzainqui, A., Sánchez-Madrid, F., and González-Amaro, R. (2013). Induction of Th17 Lymphocytes and Treg Cells by Monocyte-Derived Dendritic Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2013.
- Francois, A., Chatelus, E., Wachsmann, D., Sibilia, J., Bahram, S., Alsaleh, G., and Gottenberg, J.E. (2013). B lymphocytes and B-cell activating factor promote collagen and profibrotic markers expression by dermal fibroblasts in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 15, R168.
- Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J.H., Vestweber, D., and Wagner, D.D. (2000). P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 191, 1413-1422.

- Frenette, P.S., Subbarao, S., Mazo, I.B., von Andrian, U.H., and Wagner, D.D. (1998). Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14423-14428.
- Fuhlbrigge, R.C., Kieffer, J.D., Armerding, D., and Kupper, T.S. (1997). Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nat Rev Rheumatol.* 389, 978-981.
- Furst, D.E., Clements, P.J., Wong, W.K., Mayes, M.D., Wigley, F., White, B., Weisman, M., Barr, W., Moreland, L., Martin, R., et al. (2001). Effects of the American College of Rheumatology systemic sclerosis trial guidelines on the nature of systemic sclerosis patients entering a clinical trial. *Rheumatology (Oxford)* 40, 615-622.
- Gabrielli, A., Avvedimento, E., and Krieg, T. (2009). Scleroderma. *N Engl J Med.* 360, 1989-2003.
- Galdo, F.D., and Matucci-Cerinic, M. (2014). The search for the perfect animal model discloses the importance of biological targets for the treatment of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 73, 635-636.
- Gershwin, M.E., Abplanalp, H., Castles, J.J., Ikeda, R.M., van der Water, J., Eklund, J., and Haynes, D. (1981). Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Exp Med* 153, 1640-1659.
- Grossman, C., Dovrish, Z., Shoenfeld, Y., and Amital, H. (2011). Do infections facilitate the emergence of systemic sclerosis? *Autoimmun Rev.* 10, 244-247.
- Gruschwitz, M.S., Hornstein, O.P., and von Den Driesch, P. (1995). Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. *Arthritis Rheum* 38, 184-189.
- Gruschwitz, M.S., Shoenfeld, Y., Krupp, M., Gershwin, M.E., Penner, E., Brezinschek, H.P., and Wick, G. (1993). Antinuclear antibody profile in UCD line 200 chickens: a model for progressive systemic sclerosis. *Int Arch Allergy Immunol* 100, 307-313.
- Guiducci, S., Giacomelli, R., and Cerinic, M. (2007). Vascular complications of scleroderma. *Autoimmun Rev.* 6, 520-523.

- Gutsche, M., Rosen, G.D., and Swigris, J.J. (2012). Connective Tissue Disease-associated Interstitial Lung Disease: A review. *Curr Respir Care Rep* 1, 224-232.
- Hamaguchi, Y. (2010). Autoantibody profiles in systemic sclerosis: predictive value for clinical evaluation and prognosis. *J Dermatol* 37, 42-53.
- Hanke, K., Bruckner, C.S., Dahnrich, C., Huscher, D., Komorowski, L., Meyer, W., Janssen, A., Backhaus, M., Becker, M., Kill, A., et al. (2009). Antibodies against PM/Scl-75 and PM/Scl-100 are independent markers for different subsets of systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther* 11, R22.
- Hänsel, A., Günther, C., Ingwersen, J., Starke, J., Schmitz, M., Bachmann, M., Meurer, M., Rieber, E., and Schäkel, K. (2011). Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol.* 127, 787-794.e781-789.
- Hasegawa, M. (2010). B lymphocytes: shedding new light on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol.* 37, 3-10.
- He, X., Schoeb, T., Panoskaltsis-Mortari, A., Zinn, K., Kesterson, R., Zhang, J., Samuel, S., Hicks, M., Hickey, M., and ., D.B. (2006). Deficiency of P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand-1 leads to accelerated development of glomerulonephritis and increased expression of CC chemokine ligand 2 in lupus-prone mice. *J Immunol.* 177, 8748-8756.
- Henes, J., Schmalzing, M., Vogel, W., Riemekasten, G., Fend, F., Kanz, L., and Koetter, I. (2012). Optimization of autologous stem cell transplantation for systemic sclerosis -- a single-center longterm experience in 26 patients with severe organ manifestations. *J Rheumatol.* 39, 269-275.
- Herzog, E.L., Mathur, A., Tager, A.M., Feghali-Bostwick, C., Schneider, F., and Varga, J. (2014). Review: interstitial lung disease associated with systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis: how similar and distinct? *Arthritis Rheumatol* 66, 1967-1978.
- Hidari, K.I., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A., and McEver, R.P. (1997). Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J Biol Chem* 272, 28750-28756.
- Hinchcliff, M., and Varga, J. (2008). Systemic sclerosis/scleroderma: a treatable multisystem disease. *Am Fam Physician* 78, 961-968.

- Hinchcliff, M., Huang, C.C., Wood, T.A., Matthew Mahoney, J., Martyanov, V., Bhattacharyya, S., Tamaki, Z., Lee, J., Carns, M., Podluszky, S., et al. (2013). Molecular signatures in skin associated with clinical improvement during mycophenolate treatment in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 133, 1979-1989.
- Hirata, T., Furukawa, Y., Yang, B., Hieshima, K., Fukuda, M., Kannagi, R., Yoshie, O., and Miyasaka, M. (2004). Human P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) interacts with the skin-associated chemokine CCL27 via sulfated tyrosines at the PSGL-1 amino terminus. *J Biol Chem* 279, 51775-51782.
- Hudson, M., Fritzler, M.J., and Baron, M. (2010). Systemic sclerosis: establishing diagnostic criteria. *Medicine (Baltimore)* 89, 159-165.
- Hussein, M., Hassan, H., Hofny, E., Elkholy, M., Fatehy, N., Elmoniem, A.A., El-Din, A.E., Afifi, O., and Rashed, H. (2005). Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis. *J Clin Pathol* 58, 178-184.
- Iaccarino, L., Gatto, M., Bettio, S., Caso, F., Rampudda, M., Zen, M., Ghirardello, M., Punzi, L., and Doria, A. (2013). Overlap connective tissue disease syndromes. *Autoimmun Rev* 12, 363-373.
- Ihn, H., Sato, S., Fujimoto, M., Takehara, K., and Tamaki, K. (1998). Increased serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 37, 1188-1192.
- Iversen, L., Østergaard, O., Ullman, S., Nielsen, C., Halberg, P., Karlsmark, T., Heegaard, N., and Jacobsen, S. (2013). Circulating microparticles and plasma levels of soluble E- and P-selectins in patients with systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol* 42, 473-482.
- Julien, S., Grimshaw, M.J., Sutton-Smith, M., Coleman, J., Morris, H.R., Dell, A., Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J.M. (2007). Sialyl-Lewis(x) on P-selectin glycoprotein ligand-1 is regulated during differentiation and maturation of dendritic cells: a mechanism involving the glycosyltransferases C2GnT1 and ST3Gal I. *J Immunol* 179, 5701-5710.
- Kieffer, J., Fuhlbrigge, R., Armerding, D., Robert, C., Ferenczi, K., Camphausen, R., and Kupper, T. (2001). Neutrophils, monocytes, and dendritic cells express the same specialized form of PSGL-1 as do skin-homing memory T cells: cutaneous lymphocyte antigen. *Biochem Biophys Res Comm* 285, 577-587.

- Kuryliszyn-Moskal, A., Klimiuk, P.A., and Sierakowski, S. (2005). Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. *Clin Rheumatol* 24, 111-116.

- Lafyatis, R., and York, M. (2009). Innate immunity and inflammation in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 21, 617-622.

- Laszik, Z., Jansen, P.J., Cummings, R.D., Tedder, T.F., McEver, R.P., and Moore, K.L. (1996). P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* 88, 3010-3021.

- Le Pavec, J., Humbert, M., Mouthon, L., and Hassoun, P.M. (2010). Systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 181, 1285-1293.

- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689.

- Lichtenthaler, S.F., Dominguez, D.I., Westmeyer, G.G., Reiss, K., Haass, C., Saftig, P., De Strooper, B., and Seed, B. (2003). The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 278, 48713-48719.

- Lit, L.C., Wong, C.K., Li, E.K., Tam, L.S., Lam, C.W., and Lo, Y.M. (2007). Elevated gene expression of Th1/Th2 associated transcription factors is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 34, 89-96.

- Liu, X., Gao, N., Li, M., Xu, D., Hou, Y., Wang, Q., Zhang, G., Sun, Q., Zhang, H., and Zeng, X. (2013). Elevated levels of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in systemic sclerosis patients contribute to the secretion of IL-17 and immunosuppression dysfunction. *PLoS One* 8, e64531.

- Lorant, D.E., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A. (1995). Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces. *J Clin Invest* 96, 171-182.

- Luo, J., Xu, T., Li, C., Ba, X., Wang, X., Jiang, Y., and Zeng, X. (2013). p85-RhoGDI2, a novel complex, is required for PSGL-1-induced beta1 integrin-

- mediated lymphocyte adhesion to VCAM-1. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2764-2773.
- Manetti, M. (2015). Deciphering the alternatively activated (M2) phenotype of macrophages in scleroderma. *Exp Dermatol*.
 - Manetti, M., Guiducci, S., Ibba-Manneschi, L., and Matucci-Cerinic, M. (2010). Mechanisms in the loss of capillaries in systemic sclerosis: angiogenesis versus vasculogenesis. *J Cell Mol Med* 14, 1241-1254.
 - Martinez, M., Joffraud, M., Giraud, S., Baisse, B., Bernimoulin, M.P., Schapira, M., and Spertini, O. (2005). Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyltransferase-IV and -VII. *J Biol Chem* 280, 5378-5390.
 - Maurer, B., Distler, J.H., and Distler, O. (2013). The Fra-2 transgenic mouse model of systemic sclerosis. *Vascul Pharmacol* 58, 194-201.
 - Maurer, B., Reich, N., Juengel, A., Kriegsmann, J., Gay, R.E., Schett, G., Michel, B.A., Gay, S., Distler, J.H., and Distler, O. (2012). Fra-2 transgenic mice as a novel model of pulmonary hypertension associated with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 71, 1382-1387.
 - Mayes, M. (2003). Scleroderma epidemiology. *Rheum Dis Clin North Am*. 29, 239-254.
 - McCormick, L.L., Zhang, Y., Tootell, E., and Gilliam, A.C. (1999). Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol* 163, 5693-5699.
 - Migliorini, P., Baldini, C., Rocchi, V., and Bombardieri, S. (2005). Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity* 38, 47-54.
 - Moore, K.L., and Thompson, L.F. (1992). P-selectin (CD62) binds to subpopulations of human memory T lymphocytes and natural killer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 173-181.
 - Navarro, C. (2006). Afección pulmonar en la esclerosis sistémica. Alveolitis, fibrosis e hipertensión arterial pulmonar. *Reumatol Clin* 2, S16-19.
 - Ni, Z., and Walcheck, B. (2009). Cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) T cells up-regulate P-selectin ligand expression upon their activation. *Clin Immunol* 133, 257-264.

- Nihtyanova, S.I., and Denton, C.P. (2010). Autoantibodies as predictive tools in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 6, 112-116.
- Noda, S., Asano, Y., Nishimura, S., Taniguchi, T., Fujiu, K., Manabe, I., Nakamura, K., Yamashita, T., Saigusa, R., Akamata, K., et al. (2014). Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun* 5, 5797.
- Nuñez-Andrade, N., Lamana, A., Sancho, D., Gisbert, J., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Madrid, F., and Urzainqui, A. (2011). P-selectin glycoprotein ligand-1 modulates immune inflammatory responses in the enteric lamina propria. *J Pathol.* 224, 212-221.
- Opitz, C., Klein-Weigel, P., and Riemekasten, G. (2011). Systemic sclerosis - a systematic overview: part 2 - immunosuppression, treatment of SSc-associated vasculopathy, and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Vasa.* 40, 20-30.
- Ortiz-Santamaria, V., Puig, C., Soldevilla, C., Barata, A., Cuquet, J., and Recasens, A. (2014). Nutritional support in patients with systemic sclerosis. *Reumatol Clin* 10, 283-287.
- Ouyang, Y., Lane, W.S., and Moore, K.L. (1998). Tyrosylprotein sulfotransferase: purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2896-2901.
- Passweg, J., and Tyndall, A. (2007). Autologous stem cell transplantation in autoimmune diseases. *Semin Hematol.* 44, 278-285.
- Patel, K.P., and Bergelson, J.M. (2009). Receptors identified for hand, foot and mouth virus. *Nat Med* 15, 728-729.
- Postigo, A.A., Marazuela, M., Sanchez-Madrid, F., and de Landazuri, M.O. (1994). B lymphocyte binding to E- and P-selectins is mediated through the de novo expression of carbohydrates on in vitro and in vivo activated human B cells. *J Clin Invest* 94, 1585-1596.
- Rabquer, B., and Koch, A. (2012). Angiogenesis and vasculopathy in systemic sclerosis: evolving concepts. *Curr Rheumatol Rep.* 14, 56-63.
- Radstake, T.R., van Bon, L., Broen, J., Hussiani, A., Hesselstrand, R., Wuttge, D.M., Deng, Y., Simms, R., Lubberts, E., and Lafyatis, R. (2009). The

pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. PLoS One 4, e5903.

- Ranque, B., Authier, F.J., Berezne, A., Guillevin, L., and Mouthon, L. (2007). Systemic sclerosis-associated myopathy. *Ann N Y Acad Sci.* 108, 268-282.
- Rhew, E.Y., and Barr, W.G. (2004). Scleroderma renal crisis: new insights and developments. *Curr Rheumatol Rep* 6, 129-136.
- Rich, L., and Whittaker, P. (2005). Collagen and pricrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. morphol. Sci.* 22, 97-104.
- Rivera-Nieves, J., Burcin, T.L., Olson, T.S., Morris, M.A., McDuffie, M., Cominelli, F., and Ley, K. (2006). Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis. *J Exp Med* 203, 907-917.
- Robert, C., Fuhlbrigge, R.C., Kieffer, J.D., Ayehunie, S., Hynes, R.O., Cheng, G., Grabbe, S., von Andrian, U.H., and Kupper, T.S. (1999). Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J Exp Med* 189, 627-636.
- Roberts, J.G., Sabar, R., Gianoli, J.A., and Kaye, A.D. (2002). Progressive systemic sclerosis: clinical manifestations and anesthetic considerations. *J Clin Anesth* 14, 474-477.
- Roberts-Thomson, P., and Walker, J. (2012). Stochastic processes in the aetiopathogenesis of scleroderma. *Intern Med J.* 42, 235-242.
- Rossi, F., Corbel, S., Merzaban, J., Carlow, D., Gossens, K., Duenas, J., So, L., Yi, L., and Ziltener, H. (2005). Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol.* 6, 626-634.
- Schäkel, K., Kannagi, R., Kniep, B., Goto, Y., Mitsuoka, C., Zwirner, J., Soruri, A., Kietzell, M.v., and Rieber, E. (2002). 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* 17, 289-301.
- Schroeder, K., Herrmann, M., and Winkler, T. (2013). The role of somatic hypermutation in the generation of pathogenic antibodies in SLE. *Autoimmunity.* 46, 121-127.

- Serrador, J.M., Urzainqui, A., Alonso-Lebrero, J.L., Cabrero, J.R., Montoya, M.C., Vicente-Manzanares, M., Yanez-Mo, M., and Sanchez-Madrid, F. (2002). A juxta-membrane amino acid sequence of P-selectin glycoprotein ligand-1 is involved in moesin binding and ezrin/radixin/moesin-directed targeting at the trailing edge of migrating lymphocytes. *Eur J Immunol* 32, 1560-1566.
- Sfrikakis, P.P., Charalambopoulos, D., Vaiopoulos, G., and Mavrikakis, M. (1999). Circulating P- and L-selectin and T-lymphocyte activation and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Rheumatol* 18, 28-32.
- Shahane, A. (2013). Pulmonary hypertension in rheumatic diseases: epidemiology and pathogenesis. *Rheumatol Int.* .
- Shimada, Y., Hasegawa, M., Takehara, K., and Sato, S. (2001). Elevated serum L-selectin levels and decreased L-selectin expression on CD8(+) lymphocytes in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 124, 474-479.
- Shimoda, M., Hashimoto, G., Mochizuki, S., Ikeda, E., Nagai, N., Ishida, S., and Okada, Y. (2007). Binding of ADAM28 to P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances P-selectin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *J Biol Chem* 282, 25864-25874.
- Sonnylal, S., Denton, C.P., Zheng, B., Keene, D.R., He, R., Adams, H.P., Vanpelt, C.S., Geng, Y.J., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2007). Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum* 56, 334-344.
- Sperandio, M. (2006). Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J* 273, 4377-4389.
- Spertini, C., Bâisse, B., and Spertini, O. (2012). Ezrin-radixin-moesin-binding sequence of PSGL-1 glycoprotein regulates leukocyte rolling on selectins and activation of extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem.* 287, 10693-10702.
- Spertini, O., Cordey, A., Monai, N., Giuffrè, L., and Schapira, M. (1996). P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol.* 135, 523-531.
- Stadtmann, A., Germeña, G., Block, H., Boras, M., Rossaint, J., Sundd, P., Lefort, C., Fisher, C.I., Buscher, K., Gelschefarth, B., et al. (2013). The PSGL-

- 1-L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow. *J Exp Med* 210, 2171-2180.
- Steen, V., Denton, C.P., Pope, J.E., and Matucci-Cerinic, M. (2009). Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 48 Suppl 3, iii19-24.
 - Sticherling, M. (2012). Systemic sclerosis-dermatological aspects. Part 1: Pathogenesis, epidemiology, clinical findings. *J Dtsch Dermatol Ges.* 10, 705-718.
 - Stummvoll, G., Aringer, M., Grisar, J., Steiner, C., Smolen, J., Knobler, R., and Graninger, W. (2004). Increased transendothelial migration of scleroderma lymphocytes. *Ann Rheum Dis* 63, 569-574.
 - Toledano, C., Gain, M., Kettaneh, A., Baudin, B., Johanet, C., Cherin, P., Riviere, S., Cabane, J., and Tiev, K.P. (2012). Aldolase predicts subsequent myopathy occurrence in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 14, R152.
 - Trojanowska, M. (2010). Cellular and molecular aspects of vascular dysfunction in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 6, 453-460.
 - Truchetet, M.E., Brembilla, N.C., Montanari, E., Allanore, Y., and Chizzolini, C. (2011). Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease. *Arthritis Res Ther* 13, R166.
 - Urzainqui, A., Hoyo, G.M.d., Lamana, A., Fuente, H.d.l., Barreiro, O., Olazabal, I., Martin, P., Wild, M., Vestweber, D., Gonzalez-Amaro, R., and Sanchez-Madrid, F. (2007). Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 179, 7457-7465.
 - Urzainqui, A., Serrador, J., Viedma, F., Yanez-Mo, M., Rodriguez, A., Corbi, A., Alonso-Lebrero, J., Luque, A., Deckert, M., Vazquez, J., and Sanchez-Madrid, F. (2002). ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity* 17, 401-412.
 - Vachino, G., Chang, X.J., Veldman, G.M., Kumar, R., Sako, D., Fouser, L.A., Berndt, M.C., and Cumming, D.A. (1995). P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells. *J Biol Chem* 270, 21966-21974.

- Valentini, G., Baroni, A., Esposito, K., Naclerio, C., Buommino, E., Farzati, A., Cuomo, G., and Farzati, B. (2001). Peripheral blood T lymphocytes from systemic sclerosis patients show both Th1 and Th2 activation. *J Clin Immunol* 21, 210-217.
- Veerman, K., Williams, M., Uchimura, K., Singer, M., Merzaban, J., Naus, S., Carlow, D., Owen, P., Rivera-Nieves, J., Rosen, S., and Ziltener, H. (2007). Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs. *Nat Immunol.* 8, 532-539.
- Veldman, G.M., Bean, K.M., Cumming, D.A., Eddy, R.L., Sait, S.N., and Shows, T.B. (1995). Genomic organization and chromosomal localization of the gene encoding human P-selectin glycoprotein ligand. *J Biol Chem* 270, 16470-16475.
- Vij, R., and Strek, M.E. (2013). Diagnosis and treatment of connective tissue disease-associated interstitial lung disease. *Chest* 143, 814-824.
- Walcheck, B., Moore, K., McEver, R., and Kishimoto, T. (1996). Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J Clin Invest* 98, 1081-1087.
- Wei, J., Bhattacharyya, S., Tourtellotte, W.G., and Varga, J. (2011). Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmun Rev* 10, 267-275.
- Westmuckett, A.D., Thacker, K.M., and Moore, K.L. (2011). Tyrosine sulfation of native mouse Psgl-1 is required for optimal leukocyte rolling on P-selectin in vivo. *PLoS One* 6, e20406.
- Weyrich, A.S., Elstad, M.R., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Morrissey, J.H., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A. (1996). Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 97, 1525-1534.
- Weyrich, A.S., McIntyre, T.M., McEver, R.P., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A. (1995). Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest* 95, 2297-2303.
- Wilson, J.L., Yu, J., Taylor, L., and Polgar, P. (2015). Hyperplastic Growth of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Subjects with Pulmonary Arterial

- Hypertension Is Activated through JNK and p38 MAPK. *PLoS One* 10, e0123662.
- Yamamoto, T. (2009). Scleroderma--pathophysiology. *Eur J Dermatol* 19, 14-24.
 - Yamamoto, T. (2010). Animal model of systemic sclerosis. *J Dermatol.* 37, 26-41.
 - Yanaba, K., Takehara, K., and Sato, S. (2004). Serum concentrations of soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 are increased in patients with systemic sclerosis: association with lower frequency of pulmonary fibrosis. *Ann Rheum Dis* 63, 583-587.
 - Yang, J., Galipeau, J., Kozak, C.A., Furie, B.C., and Furie, B. (1996). Mouse P-selectin glycoprotein ligand-1: molecular cloning, chromosomal localization, and expression of a functional P-selectin receptor. *Blood* 87, 4176-4186.
 - Yoshizaki, A., Yanaba, K., Iwata, Y., Komura, K., Ogawa, A., Akiyama, Y., Muroi, E., Hara, T., Ogawa, F., Takenaka, M., et al. (2010). Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J Immunol.* 185, 2502-2515.
 - Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., and Hidalgo, A. (2011). Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118, 6743-6751.
 - Zarbock, A., Lowell, C.A., and Ley, K. (2007). Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity* 26, 773-783.
 - Zhang, J., Jacobi, A., Wang, T., and Diamond, B. (2008). Pathogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus are derived from both self-reactive and non-self-reactive B cells. *Mol Med.* 14, 675-681.
 - <http://fau.pearlashes.com/anatomy/Chapter%2032/Chapter%2032.htm>
Anatomy and Physiology labs. Florida Atlantic University

ANEXO

Publicación obtenida durante el desarrollo de la tesis y que forma parte de la misma:

Development of an autoimmune syndrome affecting the skin and internal organs in P-selectin glycoprotein ligand 1 leukocyte receptor-deficient mice.

Pérez-Frías A, González-Tajuelo R, Núñez-Andrade N, Tejedor R, García-Blanco MJ, Vicente-Rabaneda E, Castañeda S, Gamallo C, Silván J, Esteban-Villafruela A, Cubero-Rueda L, García-García C, Muñoz-Calleja C, García-Diez A, Urzainqui A

Arthritis Rheumatol. 2014 Nov;66(11):3178-89. doi: 10.1002/art.38808.

